

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET

Dina Vukoja

PRISUSTVO BAKTERIJA PORODICE *CHLAMYDIACEAE* U SLOBODNOŽIVUĆIH
PTICA RAZLIČITIH VRSTA

Diplomski rad

Zagreb, 2017

Zavod za bolesti peradi s klinikom

Predstojnik: doc. dr. sc. Željko Gottstein

Mentorica: doc. dr. sc. Danijela Horvatek Tomić

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. doc. dr. sc. Željko Gottstein

2. dr. sc. Maja Lukač

3. doc. dr. sc. Danijela Horvatek Tomić

ZAHVALA

Mojoj mentorici, koja je pridonijela svakom slovu u ovom radu i koja je nesebično odvojila svoje vrijeme i energiju kako bi mi pružila svoj maksimum.

Mojim prijateljima, koji su bili uz mene i u lijepim i ružnim trenucima, na svakoj fešti i dugosatnim učenjima. Moja zagrebačka obitelj i potpora. Bez vas, ovaj fakultet bi bio samo komad papira, ovako je dio života i dio srca.

Mojim roditeljima, za svaki razgovor potpore, svaki put do Zagreba po kiši i buri, snijegu i suncu. Za svaku pruženu šansu, novi početak, i beskrajno strpljenje. Bez vas ne bih bila ovdje gdje jesam. Vaša potpora i ljubav su sami temelj svega što ja jesam. Neizmjereno vam hvala.

POPIS PRILOGA:

Slika 1. Zastupljenost pojedinih redova ptica u ukupnom broju gnjezdarica Hrvatske, izražena brojem vrsta unutar pojedinog reda i udjelom u ukupnom broju vrsta. Redovi s manje od 5 vrsta prikazani su pod kategorijom "ostalo".

Slika 2. Crvendać s lijeva na desno - u prirodi; mlada ptica; odrasla ptica; u prirodi.

Slika 3. Crnokapa grmuša; gore lijevo – ženka; dolje desno – mužjak.

Slika 4. Krstokljun – u prirodi; gore lijevo – ženka; gore desno – mužjak; dolje – mlada ptica.

Slika 5. Zeba; dolje lijevo - ženka; dolje u sredini i desno - mužjak u zimu/ljeto.

Slika 6. Plavetna sjenica; gore u sredini - ženka; dolje lijevo - mlada ptica; dolje desno – mužjak.

Slika 7. Dugorepa sjenica; gore lijevo – mlada ptica; gore i dolje desno – odrasla.

Tablica 1. Ptice od kojih su uzeti uzorci za istraživanje.

Tablica 2. Početnice i probe za izvođenje Real-Time PCR reakcije.

Tablica 3. Rezultati real-time PCR pretrage za dokaz bakterija porodice *Chlamydiaceae*.

Tablica 4. Rezultati real-time PCR pretrage prema vrstama ptica.

Sadržaj

1. UVOD.....	6
2. PREGLED LITERATURE.....	7
2.1. PTICE.....	7
2.1.1. ANATOMSKE I FIZIOLOŠKE OSOBITOSTI PTICA.....	8
2.2. VRAPČARKE HRVATSKE.....	11
2.2.1. CRVENDAĆ (lat. <i>Erithacus rubecula</i>).....	12
2.2.2. CRNOKAPA GRMUŠA (lat. <i>Sylvia atricapilla</i>)	13
2.2.3. KRSTOKLJUN (lat. <i>Loxia curvirostra</i>).....	14
2.2.4. ZEBA (lat. <i>Fringilla coelebs</i>)	16
2.2.5. PLAVETNA SJENICA (lat. <i>Cyanistes caeruleus</i>).....	17
2.2.6. DUGOREPA SJENICA (lat. <i>Aegithalos caudatus</i>)	18
2.3. KLAMIDIOZA PTICA.....	19
2.3.1. ETIOLOGIJA	20
2.3.2. EPIZOOTIOLOGIJA I PATOGENEZA.....	22
2.3.3. KLINIČKA SLIKA	24
2.3.4. PATOMORFOLOŠKE PROMJENE	25
2.3.5. IMUNOST	25
2.3.6. DIJAGNOSTIKA	26
2.3.7. PROFILAKSA	28
2.3.8. LIJEČENJE	28
2.3.9. JAVNOZDRAVSTVENI ZNAČAJ	29
2.3.10. KLAMIDIOZA U DIVLJIH PTICA	30
3. MATERIJALI I METODE.....	33
3.1. PRIKUPLJANJE UZORAKA	33
3.2. PRIPREMA UZORAKA I IZDVAJANJE DNK.....	35
3.3. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM U STVARNOM VREMENU (Real - time PCR).....	35
4. REZULTATI	37
5. RASPRAVA	39
6. ZAKLJUČCI	41
7. LITERATURA.....	42
8. SAŽETAK.....	44
9. SUMMARY	45
10. ŽIVOTOPIS.....	46

1. UVOD

Baterije porodice *Chlamydiaceae*, unutarstanični patogeni različitih vrsta životinja i ljudi, mogu uzrokovati sustavnu, kontagioznu bolest s različitim kliničkim znakovima. Zna se da različite vrste ptica mogu prenijeti bakteriju *Chlamydia psittaci* (*C. psittaci*) na čovjeka, no poznato je da ptice mogu biti nosioci i nekih drugih klamidija (*C. abortus*, *C. pecorum* ili novih, tek nedavno opisanih vrsta *C. avium* i *C. gallinacea*).

U ovom istraživanju dokazano je prisustvo bakterija iz porodice *Chlamydiaceae* u obriscima konjunktiva, ždrijela i kloake, porijeklom od različitih vrsta slobodnoživućih ptica, ulovljenih prilikom prstenovanja u Parku prirode Učka. Ptice su lovili stručnjaci iz udruge Biom, a vezano za njihove rutinske aktivnosti prstenovanja ptica tijekom ljetnih mjeseci. Uzorci su pretraženi molekularnom metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu koja se pokazala kao praktična i jednostavna za primjenu, uz brzo dobivanje rezultata pretrage.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. PTICE

Ptice (lat. *Aves*) uz razred sisavaca (lat. *Mammalia*) su najnapredniji stupanj kralježnjaka. Riječ je o toplokrvnim životinjama koje ubrajamo u carstvo životinja (lat. *Animalia*), koljeno kralježnjaka (lat. *Chordata*). Dije se na dva podrazreda, a to su praptice ili izumrle ptice (lat. *Archaeornithes*) te današnje ptice (lat. *Neornithes*) (ANONIMUS, <https://hr.wikipedia.org/wiki/Ptice>).

Postoji znatna količina dokaza da su se ptice razvile iz dinosaura teropoda, što uključuje skupinu *Maniraptora*, porodice *Dromaeosauridae* i *Oviraptoridae*. Kako se otkriva još neptičjih teropoda koji su s njima blisko povezani, prethodno jasna razlika između ptica i neptica sve je teže određiva. Tome doprinose nedavna otkrića koja pokazuju da su mnogi manji dinosauri teropodi imali perje. Fosil prvotne ptice *Archaeopteryx* iz jure, pronađen u kasnom 19. stoljeću, poznat je kao jedna od pronađenih nedostajućih karika koja podržava teoriju evolucije, iako ga se ne smatra izravnim pretkom današnjih ptica. Druga rana vrsta ptice je *Confuciusornis* koja je živjela u ranom razdoblju krede. Druge ptice mezozoika uključuju skupine *Enantiornithes*, *Yanornis*, *Ichthyornis*, *Gansus*, te *Hesperornithiformes* skupinu. Moguće je da su ptice iz porodice *Dromaeosauridae* bile sposobne letjeti na sličan ili bolji način od *Archaeopteryxa*, dok je *Cryptovolans* u svojoj građi imao greben, kost koja služi kao uporište za mišiće krila. Po tom kriteriju, *Cryptovolans* je prije "ptica" nego *Archaeopteryx* kojemu neka od ovih obilježja današnjih ptica nedostaju (ANONIMUS, <https://hr.wikipedia.org/wiki/Ptice>).

Današnje ptice (lat. *Neornithes*), za koje je poznato da su evoluirale krajem krede dalje se dijele, s obzirom na način kretanja, na dva nadreda, a to su ptice trkačice (lat. *Paleognathae*) i ptice letačice (lat. *Neognathae*). Skupina ptica trkačica (lat. *Paleognathae*) uključuje tinamuovke Srednje i Južne Amerike kao i nojevke. Nojevke su velike ptice koje ne lete i uključuju nojeve, kazuare, kivije i emue. Skupinu ptica letačica (lat. *Neognathae*) čine dva reda (ANONIMUS, <https://hr.wikipedia.org/wiki/Ptice>).

Perad (lat. *Galloanserae*) su domaće ptice koje ljudi drže u cilju uzgoja zbog jaja, mesa i/ili perja, a koji uključuju patkarice ili guščarice (lat. *Anseriformes*) i kokoške (lat. *Galliformes*) (ANONIMUS, <https://hr.wikipedia.org/wiki/Perad>). Red novih ptica (lat. *Neoaves*) čine moderne vrste ptica poput golubova (lat. *Columbiformes*), papiga (lat. *Psittaciformes*), vrapčarki (lat. *Passeriformes*) te brojnih drugih (ANONIMUS, <https://hr.wikipedia.org/wiki/Neognathae>).

2.1.1. ANATOMSKE I FIZIOLOŠKE OSOBITOSTI PTICA

Ptice su, za razliku od drugih životinja, relativno zbijene građe. Njihov vrat, krila i noge su vrlo lagani. Teški dijelovi, posebice nožni i krilni mišići, čvrsto su zbijeni oko prsne kosti i kralježnice, što ptici omogućuje održavanje ravnoteže (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Kostur ptice se također poprilično razlikuje od drugih životinja. Najuočljiviji je dio krupni greben na prsnoj kosti na koju su učvršćeni krilni mišići. Prednji udovi su u potpunosti prilagođeni letu. Krilo je lagano, snažno i vrlo pokretljivo. Kosti krila čine sustav laganih poluga kojima upravljaju krilni mišići. Za kretanje po zemlji pticama služe noge koje nose cijeli teret tijela, te im se tijekom vremena razvio specifičan položaj bedrene kosti, razvijen pisak i intratarzalni zglobovi, poseban raspored prstiju, srastanje kralježaka u dugačku kost (*symsacrum*), itd. Ptica nema niti pravi rep već su repna pera pričvršćena za trtičnu kost koja se još naziva i pigostil. Ptice nemaju zube, a čeljusti bez zuba razvile su se u lagane, vrlo čvrste kljun koji ptici služi pri ishrani, ali i za vrlo fine precizne poslove, kao što su čišćenje i uređivanje perja. Ptice ujedno lete zahvaljujući laganom kosturu. Duge kosti ptica letačica su šuplje, a pojačane su laganim unutrašnjim potpornjima. Dio tijela koji ih razlikuje od ostalih životinja je i vrat, koji obično ima daleko više vratnih kralježaka, npr. labud ih ima 25 (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

Živčani sustav je velik s obzirom na veličinu ptice. Najrazvijeniji dio mozga je onaj koji kontrolira radnje vezane uz let, dok mali mozak koordinira pokrete, veliki mozak parenje i izgradnju gnijezda, ponašanje i navigaciju. Oči ptica prilagođene su za polijetanje, uočavanje, lov i prehranu. Ptice s očima na bočnim stranama glave imaju širok vidokrug, dok ptice s oba oka usmjerena prema naprijed, kao npr. sove, posjeduju stereoskopski vid pa mogu procijeniti udaljenost. Većina ptica ima slab osjet mirisa, uz važne iznimke kao što su kivi, kivi, kivi,

strvinari i bubnjavke. Vid ptica je obično iznimno visoko razvijen. Vodene ptice imaju posebne fleksibilne leće koje im omogućavaju prilagodbu vizualnim prilikama u vodi i zraku. Neke vrste imaju i dvostruku *foveu* (točka najoštrijeg vida). Ptičja mrežnica ima cirkulaciju oblika lepeze koja se zove *pecten*. Ptičje uho nema vanjsku ušnu školjku, ali je pokriveno perjem. U unutrašnjem uhu nalazi se puž, koji nije spiralnog oblika kao u sisavaca (ANONIMUS, <https://hr.wikipedia.org/wiki/Ptice#Anatomija>).

Tijelo ptice prekriveno je perjem uz izuzetak kljuna i stopala. Pera su veliki evolucijski izum koji je ptice izdvojio od svih ostalih životinja. Građena su od bjelančevine keratina, što im daje čvrstoću i elastičnost. Razvijajući se, pera se granaju i razdvajaju, sve dok ne stvore složenu strukturu. Ptica veliki dio vremena mora provoditi brineći se da joj pernato ruho ostane u dobrom stanju (nauljivanje, pudranje, kupanje u vodi ili prašini, mravarenje). Većina pera svake godine otpada prilikom mitarenja i nadomješta se novim. Pera nisu oblikovana samo za let, već ona griju tijelo, štite ga od vode, zagrijavaju jaja, privlače ženku, te omogućuju skrivanje. Sastoje se od pokrovnih pera koja daju oblik tijela; od paperja, nježnih pera koja se nalaze ispod pokrovnih, te pera krila i repa. Krilnih pera ima relativno malo, ali je svako od njih važno, jer djelujući sa susjednim perima oblikuje savršenu letnu površinu. Repna pera služe za upravljanje u letu, za održavanje ravnoteže, a mužjacima i za impresioniranje ženke (PRUKNER-RADOVČIĆ,2010.).

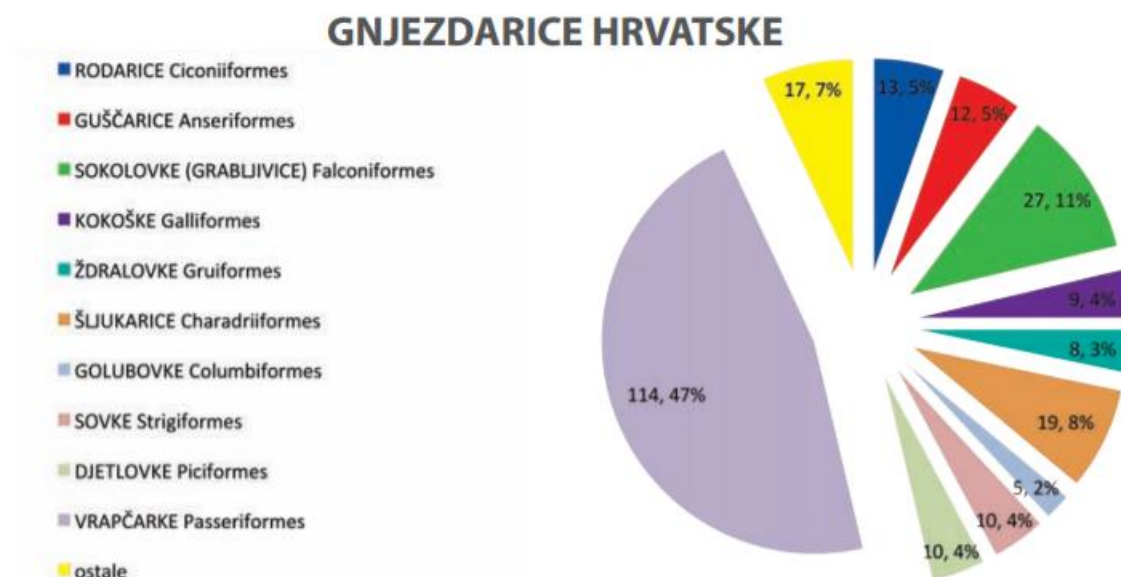
Koža ptica je tanka, suha i siromašna žlijezdama, no u repnom se dijelu nalazi trtična žlijezda (*glandula uropygii*) koja izlučuje mast potrebnu za premazivanje pera. Pticama unutrašnja građa organa i vrlo brzi metabolizam pomažu u letenju. Imaju stalnu, relativno visoku (od 38 pa sve do 43,5°C) tjelesnu temperaturu (homeotermni su) (PRUKNER-RADOVČIĆ,2010.).

Eritrociti ptica su ovalni i imaju jezgru. Disanje je, također, specifično, pluća su mala, slabo elastična i imaju spužvasto cjevastu strukturu zbog mnogobrojnih bronhiola, a ne zbog alveola kao u sisavaca. Zračne vrećice povezane su s plućima, njihovim širenjem i skupljanjem omogućuje se strujanje zraka kroz pluća, a ukupno 9 koliko ih ptica ima, zauzimaju do petine tjelesnog volumena, što znatno smanjuje specifičnu težinu tijela. Brzina i izdržljivost u ptica se jako razlikuju (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Kljunovi su u ptica vrlo raznoliki, specijaliziranih oblika koji im omogućuju uzimanje različite vrste hrane. Dušnik i grkljan se razlikuju od sisavaca, ptice imaju tzv. donji grkljan (*syrinx* ili pisk) koji se nalazi na mjestu gdje se traheja grana u bronhe. Taj organ ima složenu građu i

služi za glasanje zahvaljujući glasničnim membranama. Kod ptica je jednjak proširen u voljku u kojoj se hrana zadržava i omekšava, na koju se nastavlja predželudac ili žljezdani želudac (*proventriculus*), a spojen je s mišićnim želudcem (*ventriculus carnosus*) koji ima ulogu sitnjenja hrane. Ptice imaju relativno kratko crijevo (tanko, slijepo i debelo) koje prelazi u kloaku. U kloaku se ujedno ulijevaju mokraćovod i kanali spolnih žlijezda. Ptice nemaju mokraćni mjehur. Kod ptica je izrazito naglašena briga o potomstvu, a razlikuju se i po načinu sakupljanja i oblikovanja gnijezda, ali i po izgledu jaja što pretežito ovisi o načinu njihova života. Nakon što se izlegu, mladunci nisu prepušteni sami sebi, već ih roditelji dulji period hrane i štite (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Sve ptice liježu jaja čije su ljuske voodootporne i imaju dosta žumanjka koji služi kao hrana za zametak u razvoju.

2.2. VRAPČARKE HRVATSKE

Ornitofauna Hrvatske sastoji se od 385 vrsta ptica. Te su vrste u posljednjih dvjesto godina sa sigurnošću zabilježene u Hrvatskoj. Bogatstvo hrvatske ornitofaune najviše je vidljivo u gnjezdaricama – do sada je ukupno zabilježeno gniježđenje 243 vrste ptica od kojih je 230 vrsta recentnih gnjezdarica. Najveći broj svih gnjezdarica pripada redu vrapčarki (lat. Passeriformes) za kojima slijede sokolovke ili grabljivice (lat. Falconiformes), te šljukarice (lat. Charadriiformes) (TUTIŠ i sur., 2013).



Slika 1. Zastupljenost pojedinih redova ptica u ukupnom broju gnjezdarica Hrvatske, izražena brojem vrsta unutar pojedinog reda i udjelom u ukupnom broju vrsta. Redovi s manje od 5 vrsta prikazani su pod kategorijom "ostalo" (Izvor: CRVENA KNJIGA PTICA HRVATSKE, 2013).

Vrapčarke (lat. Passeriformes) su s oko 5.300 vrsta najveći red u razredu ptica (lat. Aves). Veličinom tijela manje su u odnosu na druge ptice. Dužina tijela im se kreće od 8 cm (neke vrste iz porodice grmuša) pa do 120 cm (iz porodice rajskih ptica ili poznate još i pod imenom rajčice). Mnoge vrapčarke su selice, dok samo neke iznimke ostaju cijelu godinu na istom području. Svi mladi su čučavci. Hrane se beskralješnjacima ili sjemenjem, ili i jednim i drugim. Od tog pravila su jedine iznimke one vrapčarke koje žive u tropskim kišnim šumama. Te se

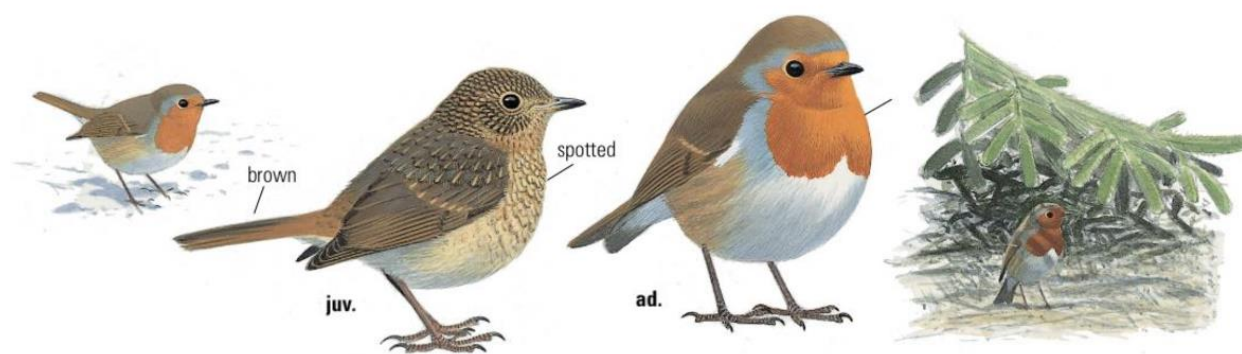
ptice hrane gotovo isključivo voćem. Suprotno njima, svračci su mesojedi. Njihova lovina su veliki kukci i mali kralježnjaci kao, primjerice, gušteri i miševi. S druge strane, rod krstokljuna iz porodice zeba živi isključivo od sjemenki crnogoričnih biljki. Taj rod je potpuno prilagođen toj vrsti hrane, te imaju prekrižen gornji i donji dio kljuna kojim, kao pincetom, vade sjemenke iz šižarki. Brljci (nazivani još i vodeni kosovi) rone u plitkim i brzim potocima i love kukce, i time spadaju u rijetke vrapčarke koje zalaze u vodu (ANONIMUS, <https://hr.wikipedia.org/wiki/Vrap%C4%8Darke>).

Podjela vrapčarki nije konačna, i za laika je prilično nerazumljiva. U stručnim krugovima se vrlo kontroverzno raspravlja i prepire oko njihove podjele. Tako razni zoolozi navode različiti broj porodica u ovom redu. Male različitosti među velikim brojem porodica često ne omogućuju izričito razlikovanje (ANONIMUS, <https://hr.wikipedia.org/wiki/Vrap%C4%8Darke>).

2.2.1 CRVENDAĆ (lat. *Erithacus rubecula*)

Crvendać je mala ptica, smeđe boje sa hrđavo crvenim 'bib-om' (prekriva cijela prsa i lice). Široka žuta pruga na krilima najočitija je na mladim životinjama. Često izgledaju kao da im je glava prevelik s obzirom na veličinu tijela. Imaju tanke i relativno duge noge. Ponekad razbaruše pera i onda izgledaju okruglo i kompaktno, no češće izgledaju vitko. Na zemlji brzo skakuću objema skupljenim nogama, opuštenih krila, spuštajući i podižući kratki rep. Veličina im varira od 12,5 cm do 14 cm. Mladi imaju fino istočkano perje, bez crvenog 'bib-a'. Pare se u šumovitim područjima, vrtovima, parkovima, rubovima šuma tj. u područjima sa gustom vegetacijom i otvorenim dijelovima. Gnijezde se u šupljim panjevima, obalama rijeke, pukotinama itd. (SVENSSON i sur., 2014). Gnijezdo grade od stabljika i mahovine, a iznutra ga oblažu vlatima trave. Od travnja do srpnja liježe najčešće 5 (3-9) jaja sa crveno smeđim pjegama. Na jajima sjede i mužjak i ženka oko dva tjedna, a o mladuncima se brinu još desetak dana. Mladi polete iz gnijezda sredinom srpnja, a roditelji odmah počinju novo leglo (<http://www.zivotinjsko-carstvo.com/ptice/kucica%20za%20ptice%20crvendace.php>). Hrane se insektima, puževima, crvima, itd. (SVENSSON i sur., 2014). Crvendać nije prava ptica selica, već je više skitalica. Seli se po cijeloj Europi na način da leti od visinskog pojasa prema podnožju planina i nizina. Prilikom prave seobe pojedina jata posjećuju Sjevernu Afriku,

Siriju, Palestinu i Perziju. Proljetna seoba je u ožujku kada se pojavljuju kod nas, a jesenja je u listopadu i studenom kada uglavnom napuštaju naše krajeve. Ipak, crvendač se i zimi vrlo često može vidjeti po našim parkovima u kojima pokušava pronaći hranu (<http://www.zivotinjsko-carstvo.com/ptice/kucica%20za%20ptice%20crvendace.php>).

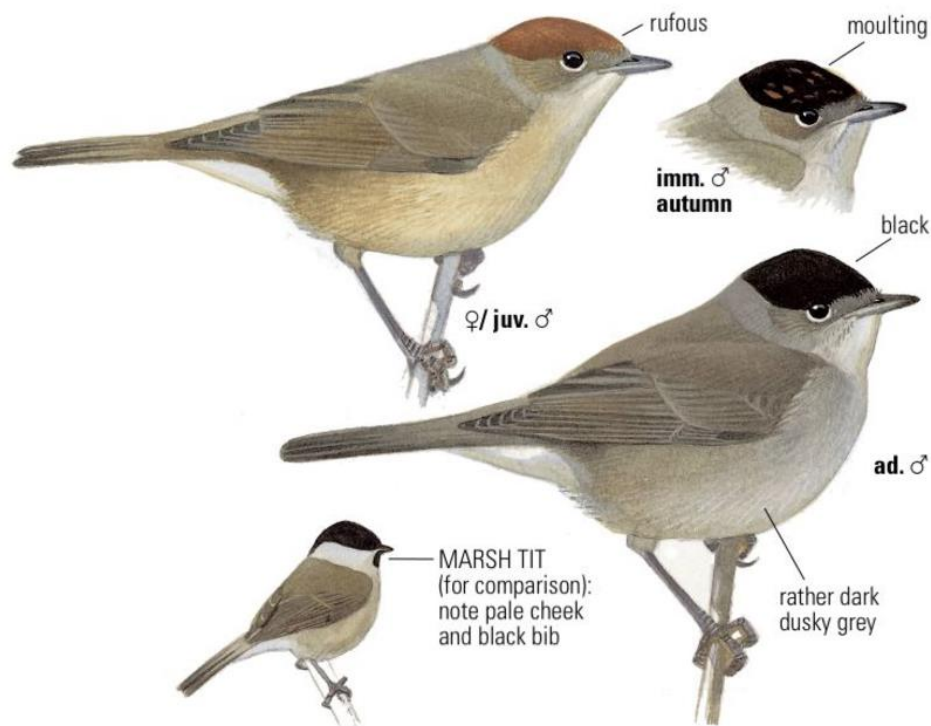


Slika 2. Crvendač s lijeva na desno - u prirodi; mlada ptica; odrasla ptica; u prirodi (Izvor: COLLINS BIRD GUIDE, 2014).

2.2.2 CRNOKAPA GRMUŠA (lat. *Sylvia atricapilla*)

Crnokapa grmuša je ptica relativno zdepaste građe prljavo sive boje gornjeg dijela tijela dok je donji dio maslinasto sive boje. Mužjak ima malenu crnu kapicu koja mu doseže do gornjeg dijela oka, dok ženke, kao i mlade ptice, imaju crveno smeđu kapicu. Na repu nepromjenjivo nedostaje bijele boje, dok su kljun i noge sive boje. Ove su ptice velike između 13,5 cm i 15 cm. Pari se u sjenovitim šumovitim područjima sa gustim podrastom ili u parkovima i vrtovima sa bujnim žbunjem (SVENSSON i sur., 2014). Rasprostranjena je u većem dijelu Europe, u zapadnoj Aziji i sjeverozapadnoj Africi. Staništa su joj bjelogorične šume i grmlja, parkovi, vrtovi, voćnjaci. U kontinentalnom području je česta premda je u tom slučaju ptica selica koja u jesen odlazi u toplije krajeve, dok je u priobalnom području trajno naseljena. Gnijezdi se dva puta godišnje od travnja do srpnja. Gnijezdo gradi od trave, dlaka, grančica i korijena. Gradi ih u gornjim dijelovima grmlja ili nižim dijelovima stabla (smreke), obično oko 1 metar iznad tla. Ženka nese 4-5 jaja na kojima oba roditelja sjede 10-12 dana. Jaja su smeđe bijela, tamnih točki i pjega. Kada se mali ptići izlegnu oba roditelja se zajedno brinu o

njima, a osamostaljuju se nakon 10-13 dana. Hrane se raznim kukcima (skakavci, pauzi, kišne gliste, vretenca) u fazi gniježđenja, kasnije većinom plodovima (bazga, kupina, maslina) (<http://www.plantea.com.hr/crnokapa-grmusa/>).

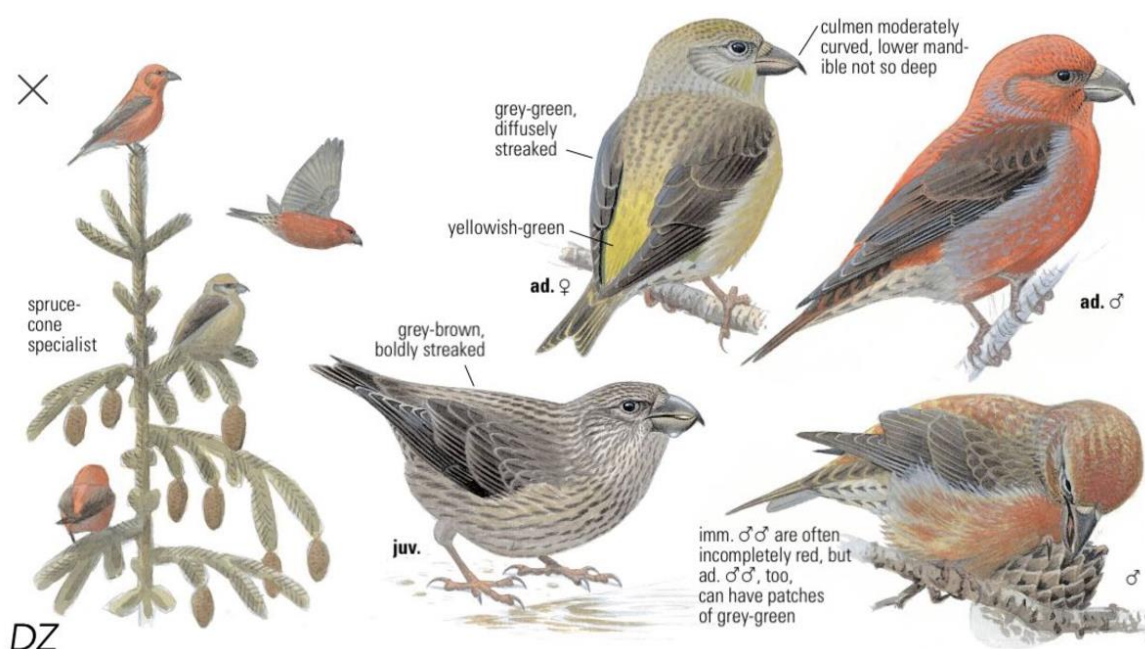


Slika 3. Crnokapa grmuša; gore lijevo – ženka; dolje desno – mužjak (Izvor: COLLINS BIRD GUIDE, 2014).

2.2.3. KRSTOKLJUN (lat. *Loxia curvirostra*)

Krstokljun (*Loxia curvirostra*) je ptica pjevica iz porodice zeba (*Fringilidae*) s prekrštenim kljunom, kojim vadi sjemenke iz češera. Ptice, koji u početku imaju ravan kljun, roditelji othranjuju usred zime. Živi u visoko planinskim četinjačkim šumama Europe, Azije i Sjeverne Amerike. Ova ptica je u Hrvatskoj stanarica. K nama zalaze veliki krstokljun (*L. pytiopsittacus*), s mnogo debljim kljunom, i bjelokrili krstokljun (*L. leucoptera*), s bijelo ispruganim krilima (<http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=34212>). *Loxia curvirostra* vrlo je slična *L. pytiopsittacus*, ali neznatno manja sa proporcionalno manjom glavom, užim vratom i manjim kljunom. Važno je naglasiti da je kljun duži nego širi,

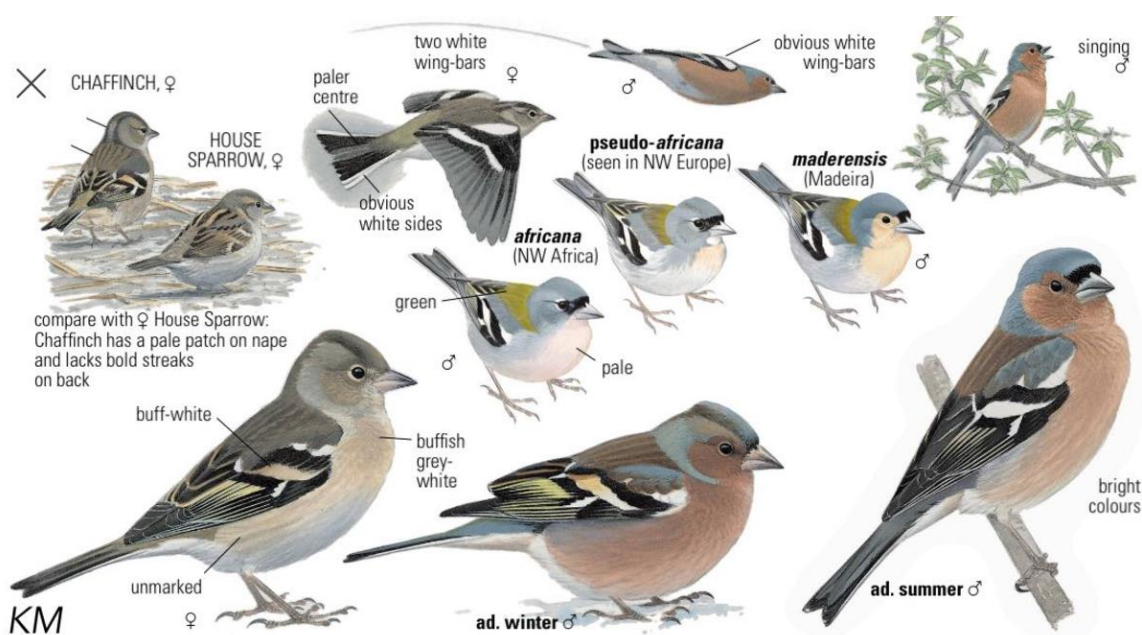
dok je pokljunica blago zakrivljena. Donji dio kljuna je manje širine od gornjeg te mu nedostaje vidljivi S-oblik s ispuččenim središtem. Odrasli mužjaci su ciglasto crvene boje po glavi, prsima i donjim dijelovima sa mogućim varijacijama žuto-narančaste i sivo-zelene boje. Odrasle ženke su sivo-zelene ili žuto-zelene boje dok im je stražnji dio tijela redovito blijedo žut, a leđa i obje strane glave smečkaste boje koja na krilima i repu prelazi u tamnu smeđe-sivu. Mlade ptice su sive sa odvažnim prugama na donjim dijelovima tijela. Pojedina isprugana pera mogu ostati čak i tijekom prve zime. Odrasle jedinke su najčešće veličine između 15 cm i 17 cm. Gnijezdi se na visinama (SVENSSON i sur., 2014).



Slika 4. Krstokljun – u prirodi; gore lijevo – ženka; gore desno – mužjak; dolje – mlada ptica (Izvor: COLLINS BIRD GUIDE, 2014).

2.2.3 ZEBA (lat. *Fringilla coelebs*)

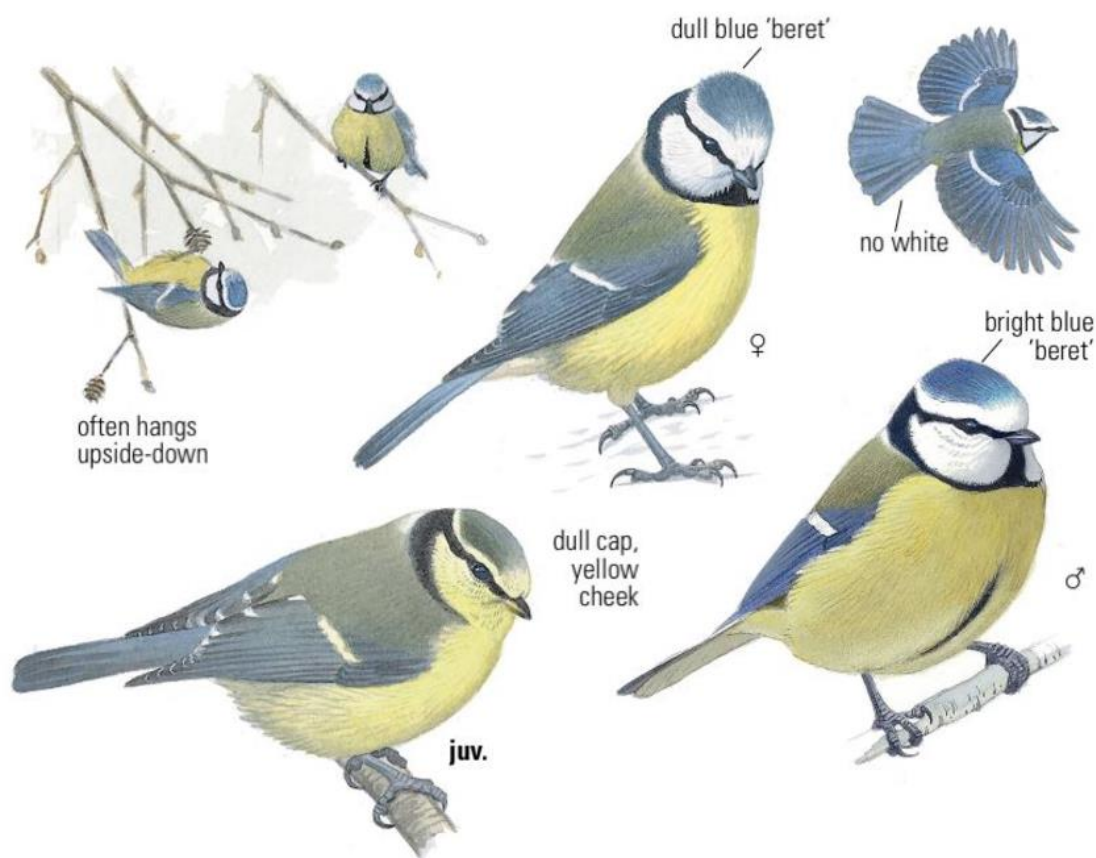
Zeba je veličinom jednaka crvendaću, ali je mršavije građe sa dužim repom. Najčešće je lako prepoznatljiva po dvostrukoj bijeloj prugi na krilima, bijelim rubovima repa i sivo-zelenom stražnjem dijelu tijela. Mužjacima su prsa i strane glave hrđavo crveni dok je kruna i potiljak plavo-sive boje, a plašt crveno-smeđi. Ženke i mlade ptice su sivo-zelene boje u gornjim dijelovima tijela sa slabim nijansama smeđe, dok su sivo-bijele boje na donjim dijelovima tijela. Bijele pruge na krilima su uže nego kod mužjaka. Let im je snažan i valovit. Tijekom migracija tvore relativno široka jata. Odrasle jedinke su najčešće duge između 14 cm i 16 cm. Pare se u svim vrstama šumovitih područja kao i u parkovima i vrtovima. Radije biraju otvorene šume od onih gustih gdje rade uredna gnijezda na mjestima gdje se granaju grane drveća, te ih kamufliraju izvana koristeći lišajeve i mahovinu (SVENSSON i sur., 2014).



Slika 5. Zeba; dolje lijevo - ženka; dolje u sredini i desno - mužjak u zimu/ljeto (Izvor: COLLINS BIRD GUIDE, 2014).

2.2.4 PLAVETNA SJENICA (lat. *Cyanistes caeruleus*)

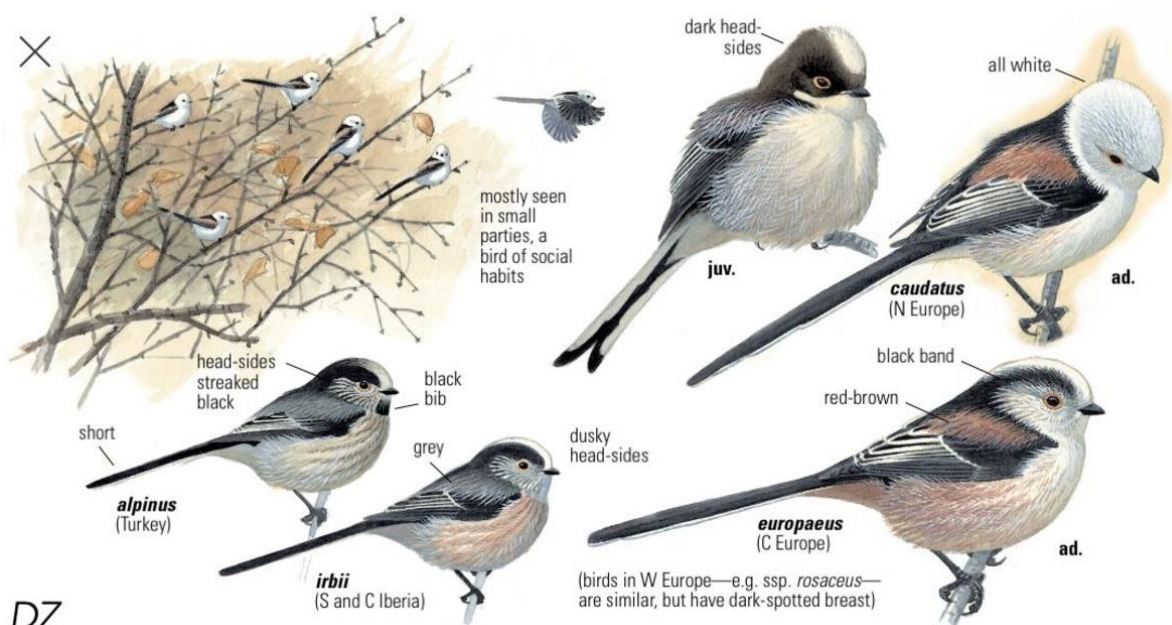
Plavetna sjenica je ptica omanjih prsa sa malom, okruglom glavom koja je izrazito blizu ramena zbog čega ponekad izgleda kao da nema vrat. Oblik tijela same ptice u kombinaciji sa živahnom naravi i naglašenim uzorkom na glavi (crna crta na području oka i malena plava kapica na glavi bijele boje) čine je izrazito atraktivnom. Donji dijelovi tijela su žute boje sa uskom sivo-crnom prugom na trбуhu. Krila su joj plavičaste boje sa svijetlo plavom nijansom na prikrivenim dijelovima. Mužjaci i ženke izgledaju vrlo slično uz naglasak da su boje na ženki nešto manje naglašeni. Odrasle jedinke su najčešće velike između 10,5 cm i 12 cm. Pare se u šumovitim područjima, preferirajući listopadne ili miješane šume, te u parkovima i vrtovima. Gnijezde se u rupama ili kutijama za gniježđenje (SVENSSON i sur., 2014).



Slika 6. Plavetna sjenica; gore u sredini - ženka; dolje lijevo - mlada ptica; dolje desno - mužjak (Izvor: COLLINS BIRD GUIDE, 2014).

2.2.5 DUGOREPA SJENICA (lat. *Aegithalos caudatus*)

Dugorepa sjenica je ptica vrlo malih, ali okruglih prsa sa dugačkim repom koja za vrijeme letenja izgleda poput male, blijede loptice sa repom. Let je preskakajući sa kratkim valovima. Hvata se za tanke grančice poput akrobata i čak može visjeti naopačke. Glava i donji dijelovi tijela su joj bjeličasti sa širokom crnom crtom koja se proteže od strane samog čela sve kroz krunsku liniju. Uši su joj prekrivene tamnim perjem, dok su bokovi i trbuh crvenkasto-smeđe boje, a na samim prsima je često ogrlica od tamnih točki. Leđa su joj crne boje, sa crvenim i crvenkasto-smeđim perjem na skapularnom području. Uski rep je crne boje sa bijelim rubovima. Kljun joj je kratak, a oči su crne i male nalik zrnju papra dok je gornji kapak žuto-narančaste boje. Oba spola izgledaju vrlo slično. Mlade ptice imaju cijelo čelo i stranu glave tamne boje, dok im je koža oka blijedo crvene boje. Odrasle jedinke veličinom variraju između 13 cm i 15 cm. Pare se u listopadnim i mješovitim šumama sa bogatim žbunjem, nešto mrtvog drveća, kao i grmovitim područjima. Često se može vidjeti u malim obiteljskim skupinama koje se brzo kreću kroz drveće i vrtove. Grade zatvorena, ovalna gnijezda od mahovine potpomognute mrežom pauka, te su mudro zakamuflirana korom drveća i lišajevima na mjestima gdje se granaju grane drveća (SVENSSON i sur., 2014).



Slika 7. Dugorepa sjenica; gore lijevo – mlada ptica; gore i dolje desno – odrasla jedinka (Izvor: COLLINS BIRD GUIDE, 2014).

2.3 KLAMIDIOZA PTICA

Klamidioza (ornitoza, psitakoza, papagajska groznica) je u prirodnoj pojavi vrlo kontagiozna akutna zooantroponoza. Rjeđe je kroničnog tijeka. Opasna je za mlade kavezne ptice, ptice selice i druge ptice što žive slobodne u prirodi kao i za domaću perad, posebice purana, patku i goluba. Klinički se očituje oštećenjem organskih sustava, dišnog ili crijevnog (BIĐIN, 2008.).

Klamidioza je kontagiozna zarazna bolest različitih ptičjih vrsta uzorkovana unutarstaničnom bakterijom *Chlamydia psittaci* (*C. psittaci*). Kad se ovom bakterijom zarazi čovjek, bolest nazivamo psitakoza (grč. *psittakos* – papagaj). Ornitoza je naziv korišten za istu bolest u domaće i divlje peradi te u ptica koje ne pripadaju rodu psitacida (papagajke). Nekoć se vjerovalo da je psitakoza koju prenose papige za čovjeka mnogo opasnija bolest od ornitoze, no danas je poznato da u ljudi jednako tešku bolest mogu prouzročiti i serotipovi klamidija od kojih najčešće obolijevaju purani, patke, golubovi, kao i neke druge vrste ptica. Bolest je opisana u više od 130 nepapagajskih vrsta ptica (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Prvi zabilježeni slučaj bolesti uzrokovane bakterijom *C. psittaci* opisao je Jürgensen 1874. godine u Švicarskoj kao nepoznatu bolest u ljudi koji su bili u doticaju s pticama. Smatra se da su prvo detaljno istraživanje klamidija započeli istraživači Halberstaedter i von Prowazek 1907. godine pronalaskom karakterističnih intracitoplazmatskih mikroorganizama unutar vakuola u stanicama konjunktivalnih strugotina ljudi oboljelih od trahoma. Kako su organizmi izgledali kao zaogrnuti plaštom, nazvali su ih *Chlamydozoaceae*, prema grčkoj riječi *chlamys* što znači plašt. U to se doba mislilo da su to protozoe. Dugo vremena bio je nepoznat stvarni uzročnik klamidioze, uglavnom zbog vrlo neobičnog razvojnog ciklusa ove skupine bakterija. Bolest je osobito postala poznata za vrijeme pandemije 1929. – 1930. godine, koja je zahvatila 12 država SAD-a. Vjerovalo se da je uvezena sa zelenim amazonama iz Južne Amerike. Do danas je poznato 469 različitih vrsta domaćih i slobodno živućih ptica svrstanih u 30 redova, koje mogu biti nositelji klamidija, a zna se i da sve ptice mogu prenijeti ovu bolest na čovjeka (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

2.3.1 ETIOLOGIJA

Uzročnik bolesti je obligatna unutarstanična gram-negativna bakterija *C. psittaci*. Ona pripada redu Chlamydiales, te se ranije smatralo da se radi o dva roda: *Chlamydia* i *Chlamydophila* gen. nov. Po novoj nomenklaturi, razlikujemo rod *Chlamydia* i slijedeće vrste: *C. abortus* (ovca, koza, govedo), *C. caviae* (zamorac), *C. felis* (mačka), *C. pecorum* (ovca, govedo), *C. pneumoniae* (čovjek) i *C. psittaci* (ptice), te dvije nove vrste *C. avium* i *C. gallinarum* (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). *Chlamydia trachomatis*, *C. muridarum* i *C. suis* pretežito su patogene za čovjeka, miša ili svinju, dok su *C. pneumoniae*, *C. abortus*, *C. pecorum*, *C. felis*, *C. psittaci* i *C. caviae* patogene za čovjeka, preživače, ptice, mačku i zamorčica. Mnoge od klamidija zaraze više od jednog domaćina pa su u nekim slučajevima uzročnici zoonoze, osobito *C. psittaci* i *C. abortus* (BIĐIN, 2008.).

Klamidije su bakterije koje sadržavaju DNA i RNA. Okruglasta su oblika promjera 0,2 – 2 µm. Kao i druge gram-negativne bakterije, okružene su troslojnom citoplazmatskom membranom i troslojnom vanjskom membranom. Kompleks vanjske membrane sastoji se od glavnog proteina vanjske membrane (*major outlet membrane protein* – MOMP) i nekih manjih proteina (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

Rudimentarna stanična stjenka bez kiselina ili peptidoglikana sama može sintetizirati vrsno – specifične enzime, ali ovisi o staničnoj energiji domaćina pa koristi adenozin trifosfat i nikotinamid adenozin triptofan, te vjerojatno i neke aminokiseline (BIĐIN, 2008.).

Morfogeneza klamidija je specifična pa se tijekom razvojnog ciklusa bakterija pojavljuje u najmanje tri različita morfološka oblika: retikularno tjelešce, intermedijarno tjelešce i elementarno tjelešce. Izvanstanični infektivni oblik, elementarno tjelešce (ET) je veličine 0,2 – 0,3 µm, elektronski je gusto i okruglasto, metabolički neaktivno i osmotski otporno na stres pa osigurava preživljavanje izvan nositelja. Intermedijarno je tjelešce veličine 0,3 - 1 µm. Retikularno tjelešce (RT) je unutarstanični replikacijski oblik, također je okruglo, ali veće od ET-a (0,5 - 2 µm). Razvojni ciklus započinje prihvatanjem ET-a za mikrovile vršnog dijela visokoprizmatičnih epitelnih stanica primljivog tkiva, nakon čega slijedi ulazak u stanicu nositelja. U njoj se klamidije nalaze unutar vakuola (u plaštu) koje su nastale invaginacijom stanične membrane nositelja i transformiraju se u metabolički aktivno retikularno tjelešce. Retikularno tjelešce sadržava DNA i tri puta više RNA, a stvara se unutar stanice nekoliko sati

poslije endocitoze. Poslije toga dolazi do umnažanja binarnom fisijom i stvaranja kolonija, tj. intracelularnih odjeljaka poznatih kao inkluzije (Levinthal-Cole-Lille ili LCL-tjelešca). Nakon umnažanja retikularna tjelešca dozrijevaju kroz intermedijarni oblik u nova infektivna elementarna tjelešca koja se lizom oslobađaju iz stanice nositelja i zaražavaju druge stanice. Cijeli taj ciklus traje negdje između 48 – 72 sata. Elementarna tjelešca nalazimo u iscjetku iz očiju i nosa te izmetu (infektivni oblik), za razliku od retikularnog koji se nalazi samo u stanicama nositelja (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

Sažeto, razvojni ciklus klamidije u stanici domaćina uključuje prihvatanje i prodor zarazno – toksičnog elementarnog tijela u ciljnu stanicu, većinom visokoprizmatičnih epitelih stanica sluzničkih membrana i mononuklearne makrofage; prijelaz metabolički neaktivnog elementarnog tjelešca u veliko, lomljivo, metabolički aktivno retikularno tjelešce; rast i diobu retikularnog tjelešca te nastanak brojnih novih tjelešaca što se nazivaju inkluzije (Levinthal-Cole-Lille ili LCL-tjelešca), te sazrijevanje nezaraznog retikularnog tjelešca u zarazno elementarno tjelešce i otpuštanje elementarnih tjelešaca iz stanice domaćina. Razvojne mikrokolonije mogu sadržavati od 100 do 500 potomaka. U slučaju *C. psittaci*, invadirana je stanica domaćina jako oštećena, a klamidiju otpušta lizom 48 sati poslije zaražavanja (BIĐIN, 2008.).

Bakterija *C. psittaci* ima nekoliko serovarova: A, B, C, D, E, F, E/B, M56 i WC. Oni se razlikuju po imunosnoj reakciji sa skupom monoklonskih protutijela koja prepoznaju specifične epitope glavnoga proteina vanjske membrane. Na temelju dosadašnjih istraživanja utvrđeno je da svaki serovar ima manju ili veću specifičnost za nekog nositelja. Serovar A je, primjerice, endemičan među papigama, a u ljudi uzrokuje sporadičnu zoonozu, dok je Serovar B endemičan među golubovima, ali je izdvojen i iz purana, grlica te identificiran kao uzročnik abortusa u mliječnih goveda. Serovar C je dobiven iz purana, pataka i jarebica, a sojevi serovara D su izdvojeni iz purana, morskog galeba, papiga i ljudi. Serovar M56 izoliran je u zečeva i mošusnih štakora (*Ondatra zibethicus*), a serovar WC izdvojen je tijekom epidemije enteritisa u goveda. Najnoviji serovar E/B izdvojen je iz pataka i gusaka te golubova. Usporedbom serotipizacije i genotipizacije uspjelo se dokazati da serovarovi odgovaraju genotipovima koji su definirani svojim restrikcijskim obrascima. Do danas je utvrđeno 16 različitih genotipova, uz već navedene serovarove nalazimo još i dodatnih 6 genotipova (1V, 6N, Mat116, R54, YP84 i CPX0308 (SACHSE i sur., 2008.). Serovarovi se jako razlikuju s obzirom na virulentnost i antigenost. Patogenost se ne može

potpuno objasniti izravnim oštećenjem stanice domaćina. Najznačajniji čimbenik virulencije pojedinih sojeva je toksin različita intenziteta, blisko vezan za vanjsku membranu elementarnog tjelešca. Tijekom rasta klamidije u određenom domaćinu nastaju metaboličke i strukturne promjene što mijenjaju virulenciju i antigenost. Jačina promjena je pod utjecajem broja umnožene klamidije i vrste domaćina. Antigenost klamidija je također jako složena, a u osnovi se sastoji od imunodominantnih, rodspecifičnih lipoglikoproteina i brojnih proteina različite molekulske mase. Lipoglikoprotein zajednički svim klamidijama ima kiseli termostabilan (100°C tijekom 30 minuta) polisaharid, otporan na 0,5% fenol (BIĐIN, 2008.).

Infektivnost tkivnoga homogenata koji sadržava klamidiju pri temperaturi od 4°C dugotrajna je te iznosi i do 50 dana, pri temperaturi od 22°C infektivnost traje 12 dana, dok je pri temperaturi od 55°C inaktivirana već za pet minuta. U osušenom izmetu ova bakterija može ostati infektivna nekoliko mjeseci te zaraženi predmeti mogu biti izvor infekcije. Pri temperaturi od -20°C ova bakterija može ostati dulje razdoblje infektivna, dok pri temperaturi od -70°C, ili liofilizirana, zadržava infektivnost godinama. Klamidija je jako osjetljiva na tvari što oštećuju količinu njezina lipida ili cjelovitost njezine stanične stijenke kao što su već navedeni kvaterni amonijevi spojevi ili otapala za mast (eter, kloroform, formalin), a nešto je manje osjetljiva na kiseline i alkohole (BIĐIN, 2008.).

2.3.2 EPIZOOTIOLOGIJA I PATOGENEZA

U ptica reda Psittaciformes klamidija je prisutna u oko 1% populacije koja živi u divljini, pa se smatra endemičnom vrstom. Dugo se vjerovalo da je bolest učestala samo u papiga, no 1940. godine opisana je i u golubova, a 1950-ih godina počela se pridavati važnost i inficiranim puranima i patkama koji su bili izvor infekcije za čovjeka. Do sada je zabilježeno da je ptica reda Psittaciformes, koji broji 342 poznate vrste, klamidija izdvojena iz 153 vrste (45%). U porodica ptica koje većinom žive na moru, obalama ili drugim vodama (galebovi, patke, pingvini i guske), klamidije su izdvojene iz oko 20% vrsta, dok kod vrlo često pregledavanih ptica reda Galliformes (kokoši, fazani i prepelice) izdvojene su iz svega 5% (u 14 od 259 vrsta) (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

Razlikujemo jako virulentne serovarove *C. psittaci* koji su najčešće izdvojeni iz papiga i purana, te slabo virulentne sojeve koji se pojavljuju u pataka, golubova i drugih ptica. Jako virulentni sojevi nazivaju se i toksogeni, jer uzrokuju naglu pojavu bolesti s mortalitetom od 5% do 30%, za razliku od slabo virulentnih sojeva koji uzrokuju mortalitet manji od 5%. Česte su latentne infekcije kod ptica, a prisutnost zaraze primjećuje se tek potvrđenim prijenosom uzročnika sa životinje na životinju ili na čovjeka te naglim uginućem mladih ptica – potomaka zdravih roditelja. Osim o virulentnosti, daljnji razvoj bolesti ovisi i o broju infektivnih ET-a. Izvor zaraze su najčešće ptice s nesimptomatskim oblikom bolesti, bolesne ptice s klinički izraženim simptomima te lešine zaraženih ptica (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Osnovni su vektori nesumnjivo ptice, bilo kao inaparentni nositelji ili kao sekundarno zaražene vrste što podržavaju širenje klamidije uzduž selidbenog puta. Potvrđeno je i vertikalno širenje uzročnika u papiga, kokoši, galeba, pataka i snježne guske, ali opseg toga nije poznat. Klamidija se u nezaraženo jato unosi i perzistentno zaraženim pticama. Psitacide i golubovi su često subklinički zaražene ptice koje povremeno izlučuju uzročnika. Smatra se da je perzistentna zaraza uobičajena i u drugih vrsta ptica. Primjena antibiotika (klortetraciklina) samo će vremenski zadržati izlučivanje pa nije pouzdana u liječenju perzistentnih zaraza. Pogreške u liječenju rezultiraju kliconoštvom u kasnijem tijeku života. Zaraza se u komercijalna jata domaće peradi unosi i onečišćenom opremom i hranom i iz tog razloga je nužno dobro pranje i dezinfekcija jer u izmetu klamidija preživi i do 30 dana (BIĐIN, 2008.).

Bakterija *C. psittaci* izlučuje se izmetom, mlijekom iz voljke goluba te oralnim, nazalnim i ždrijelnim iscjetkom. Prilikom čišćenja perja ptice prenose klamidije iz ždrijela na perje. Posredno se bakterije prenose i prašinom s perja uprljanog kontaminiranim izmetom, a prašinom od sasušenog izmeta ili drugih izlučevina dopijevaju i u okoliš, posebice u vodu i hranu. Izlučivanje klamidija izmetom u pravilu započinje deset dana prije očitovanja kliničkih znakova bolesti. Međutim, infekcije mogu perzistirati u subkliničkom obliku s povremenim izlučivanjem bakterije tijekom duljeg razdoblja. Izlučivanje izmetom učestalo se aktivira stresnim čimbenicima poput pretrpane nastambe, hlađenja, razmnožavanja, hranjenja, čak i liječenja. Prijenos klamidije jajima opisan je u kokoši, pataka, papiga, purana, morskih galebova i snježnih gusaka, ali smatra se da je takav put prijenosa uzročnika izuzetno rijedak. Utvrđeno je da ektoparaziti prenose klamidije u purana, ali smatra se da više djeluju kao mehanički nego kao biološki vektori (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Pretpostavlja se da je

promjena stanja infekcije u klinički očitovanu bolest posljedica egzogenih i endogenih čimbenika. Od egzogenih su čimbenika važni loši uzgojni ili klimatski uvjeti, dok su endogeni početak spolnog sazrijevanja i istodobne infekcije s različitim drugim uzročnicima zaraze. Negativan utjecaj klimatskih čimbenika primijećen je u mnogo vrsta tropskih ptica koje se danas drže u zatočeništvu u zemljama sjeverne hemisfere, gdje posljedično češće obolijevaju nego ptice koje su se tijekom filogeneze prilagodile toj klimi. Mlađe su ptice prijemljivije na bolest od starijih. Česte pasaže kroz organizam nositelja sisavaca i ptica mijenjaju fizikalni-kemijska svojstva te antigenost i toksično svojstvo bakterije (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Inkubacija bolesti ovisi o vrsti ptice, virulentnosti soja te načinu zaražavanja. Vrijeme inkubacije u mlađih dobnih skupina ptica je najčešće tri dana, dok je u starijih zabilježeno nekoliko mjeseci, pa i više godina. Osim bakterijom *C. psittaci* ptice, kao i ostale životinje, mogu biti zaražene i drugim vrstama klamidija (npr. bakterijom *C. abortus*) (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

2.3.3 KLINIČKA SLIKA

Bakterija *C. psittaci* u mlađih ptica često uzrokuje akutnu infekciju, dok spolno zrelih starijih ptica infekcija prolazi najčešće asimptomatski. Akutni stadij infekcije očituje se poremećajem rada dišnih organa, ptice su letargične, anoreksične, hipotermične i nakostriješenog perja, a najčešće je i prisutan proljev. U subakutnoj i kroničnoj fazi bolesti pojavljuje se poremećaj rada središnjeg živčanog sustava (SŽS) klonično – toničnog tipa (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

Tipični klinički simptomi uzrokovani jako virulentnim sojevima uključuju pneumoenteritis s dišnim simptomima, mukopurulentni nosni iscjedak, nevoljkost, proljev i poliuriju. Izmet je uobičajeno žuto-zelen. Manje virulentni sojevi uzrokovat će slične kliničke simptome kao i jako virulentni, ali su oni blaži. Nesimptomatsku zarazu mogu uzrokovati i jako i slabo virulentni sojevi (BIĐIN, 2008.). Klinički znakovi bolesti u papiga, posebice amazonskih papiga, crvenih ara (makao), afričkih sivih papiga (žako), kakadua i nimfa, najčešće su poremećaji središnjeg živčanog sustava: tortikolis, opisthotonus, tremor i prisilne kretnje, te paraliza ili pareza nogu. Često su to jedini vidljivi klinički znakovi, jer akutni tijek bolesti nerijetko prolazi bez njih. Katkad se pojave poremećaji u opernaćivanju. Nimfe, uz te

znakove, mogu imati jednostrani ili obostrani konjunktivitis i keratokonjunktivitis, a u fecesu se intermitentno pojavljuju žuti urati, dok je u papiga tigrica učestao sinusitis (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Hematološka pretraga upućuje na leukocitozu s naglaskom na heterofiliju i pojavu toksičnih heterofila, a u nekim slučajevima i monocitozu, limfocitozu i bazofiliju. Utvrđena je i anemija te povećanje vrijednosti enzima AST (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

2.3.4 PATOMORFOLOŠKE PROMJENE

Patoanatomski nalaz u ptica koje su zaražene klamidijom nije patognomoničan i ovisan je o brojnim čimbenicima, uključujući osjetljivost nositelja, virulenciju soja, ulazna vrata uzročnika i istodobno postojanje druge bolesti. Učestale su sekundarne infekcije drugim bakterijama i gljivicama, posebice *E. coli*, *Salmonella* spp., *Aspergillus* spp., ali i druge, koje mogu promijeniti patomorfološku sliku u uginulih ptica. Nalaz hepatomegalije, splenomegalije i fibrinske upale zračnih vrećica pobuđuje stvarnu sumnju na klamidiozu. Prilikom razudbe u akutnoj fazi bolesti često je vidljivo povećanje slezene koja je obično mekše konzistencije. Na površini može sadržavati bijela nekrotična žarišta i petehijalna krvarenja. Jetra su povećana, prhka, žućkasta ili zelena, a mogu biti prisutne fokalne nekroze u kojima se nalaze karakteristične intracitoplazmatske inkluzije te fibrinozni perihepatitis. Membrane zračnih vrećica su zadebljane i zamućene, a katkad mogu biti prekrivene debelim, žućkastim, fibrinopurulentnim eksudatom. Pluća su obično difuzno kongestirana dok pleuralna šupljina može sadržavati fibrinski eksudat. Kronične infekcije uzrokuju izraženu fibrozu i mononuklearne infiltrate jetre te nekrozu gušterače, osobito u tigrica i golubova (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

2.3.5 IMUNOST

Imunost prema klamidijama je općenito kratkotrajna i slaba. Unatoč zaražavanju, odrasle su ptice dobro otporne na kliničku bolest. Golubovi su refraktarni na kliničku bolest, čak ako je zarazu uzrokovao i jako virulentan soj. Purani dobi od 15 tjedana su u određenom stupnju

dobno otporni i ona blago raste s povećanjem dobi. Čini se da je za otpornost na ponovnu zarazu odgovorna i humoralna i stanična imunost, ali intracelularni položaj bakterije upućuje na to da je stanična imunost učinkovitija od humoralne. Prevladavajuća je komponenta zaštitne imunosti proizvodnja specifičnih CD4⁺T stanica vezanih za klasu II glavnog kompleksa tkivne podudarnosti, iako važnu ulogu imaju i CD8⁺T stanice i protutijela. Sluznički IgA i serumski IgG što djeluju na glavni vanjski membranski protein klamidija mogu joj smanjiti zaraznost. Stanična je zaštitna reakcija usko vezana za interferon- γ što, ovisno o dozi, ograničava rast bakterije poticanjem biomolekulskog puta, mijenjajući stanični metabolizam i smanjujući iskorištavanje esencijalnih tvari (triptofan i željezo) ili stvarajući dušikov oksid što na bakteriju djeluje toksično. Serumski IgG, sekretorni IgA i stanična imunost slabe ili nestaju za 30 dana pa se ptice mogu ponovno zaraziti (BIĐIN, 2008.).

2.3.6 DIJAGNOSTIKA

Dijagnozu olakšava anamneza, klinički i makroskopski nalaz, a potvrđuje izdvajanje uzročnika i dokaz intracitoplazmatskih uklopina u otisku upalnog eksudata, površine zračne vrećice ili epikarda (BIĐIN, 2008.). Osnovni preduvjet za uspješnu dijagnostiku klamidioze jest pravilan odabir materijala za pretragu, način uzorkovanja, skladištenje te transport uzoraka do dijagnostičkog laboratorija. Povijest bolesti bitna je zbog činjenice da većina psitacida oboli približno tri do četiri mjeseca nakon što su nabavljeni kao ljubimci ili nakon dodira novonabavljene ptice s "udomaćenima". Dijagnostika klamidioze moguća je identifikacijom uzročnika, ili izdvajanjem ili dokazom njegove prisutnosti u uzorku (dokazom antigena) postupcima ELISA, *Clearview*-test, PCR, Real-Time PCR, histološkim i imunohistokemijskim bojenjem obrisaka ili otisaka slezene i jetre i bojenjem citoloških preparata. Za posredan dokaz prisutnosti klamidija, od seroloških pretraga preporučene su metode reakcija vezanja komplementa (RVK), ELISA, imunodifuzija u gelu, lateks-aglutinacijski test (LA), aglutinacija elementarnih tjelešaca (*elementary body agglutination* – EBA) i mikroimunofluorescentni test (*micro-immunofluorescence test* – MIFT) (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Zaživotno se pretražuju citološki preparati, uzimaju tzv. trojni otisni preparati: sluznice vjeđe ili iscjetka iz nosnih otvora, obrisak ždrijela, te obrisak kloake. Za tumačenje preparata bitna je prisutnost

epitelnih stanica u kojima nalazimo intracitoplazmatska tjelešca (*Levinthal-Cole-Lille*, LCL-tjelešca). Nakon sušenja na zraku ili na plamenu, za vizualizaciju klamidija preparati se boje metodama po Stampu, Giemsi, Gimenezu, Machiavellu ili Castanedi. Negativan rezultat ne isključuje klamidiozu, budući da se boje isključivo elementarna tjelešca. Iz uzorka izmeta uzročnik se može izdvojiti uzgojem na kulturi stanica (najčešće McCoy, HeLa i pileći fibroblasti), umnažanjem na kokošjim zametcima ili ubrizgavanjem zaraženog materijala u pokusni životinju (miš). Iz uzorka se može detektirati prisutnost antigena postupcima ELISA, *Clearview Chlamydia* metodom ili PCR, odnosno postupkom Real-Time PCR, te DNA-*microarray* testom. Uzorak treba poslati na pretragu u transportnom mediju. Za sada je najbolji i najsigurniji postupak onaj pri kojem se antigen dokazuje iz prethodno ekstrahirane DNA, a osjetljiva i specifična pokazala se i ELISA-proba kojom možemo dokazati prisutnost antigena u obrisku (također se uzima trojni obrisak konjunktiva, ždrijela i kloake). Lažno pozitivna reakcija pri *Clearview Chlamydia* probi i ELISA-i moguća je samo u slučaju ekstremno velikog broja *Staphylococcus aureus* u uzorku, stoga se usporedno radi i klasična bakteriološka pretraga (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Postmortalno se uzimaju otisni preparati slezene, zračnih vrećica, jetre, perikarda i pluća, te se boje već spomenutim metodama bojenja za dokaz klamidije ili se već spomenutim postupcima dokazuje prisutnost antigena. Bojenje otisnutih preparata fluorescentnim protutijelima može dati nespecifičnu reakciju. Najsigurniji je dokaz izdvajanje uzročnika na kulturi stanica ili kokošjim zametcima. Ako se dokazuju humoralna protutijela, valja imati na umu da nalaz protutijela nije dokaz bolesti, no katkad može upozoriti na inaparentnu infekciju. Protutijela se mogu dokazati u pravilu u četvrtine do trećine svih pretraženih papagaja, a u gradskih golubova i do 90 % ptica može biti pozitivno, no bez izraženih kliničkih simptoma bolesti (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Diferencijalno dijagnostički valja isključiti virusne bolesti koje uzrokuju poremećaje SŽS-a, cirkovirusne infekcije, herpesvirusne, te bolesti uzrokovane enterobakterijama, pasterelama, mikoplazmama i neke gljivične bolesti, poput aspergiloze (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Zadnjih desetak godina, molekularne metode sve se češće koriste u dijagnostici klamidioze ptice, posebice konvencionalni PCR ili real-time PCR (SACHSE i sur., 2009.). Rezultati ovih pretraga brzo su dostupni i pouzdani a specifičnim početnicama umnaža se neki od gena klamidija, najčešće *ompA*, *incA*, *enoA* ili 23S rRNA (SACHSE i sur., 2009.).

2.3.7 PROFILAKSA

Važno je provesti pravilnu karantenu pri nabavi nove ptice, i to najmanje u trajanju od 45 dana, redovito kontrolirati zdravlje ptica u uzgoju te onih u transportu (izložbe, natjecanja, prodaja). Dobrom higijenom i poboljšanjem zoosanitarnih uvjeta smanjit će se horizontalno širenje infekcije. Vrlo je važna kvaliteta zraka s optimalnom vlagom i temperaturom, te dezinfekcija i deratizacija. U nekim se zemljama provodi preventivno liječenje tijekom karantene. Cjepivo protiv klamidioze ptica se ne primjenjuje, iako se provode opsežna istraživanja o primjeni cjepiva u purana i druge peradi (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Suzbijanje zaraze temelji se na primjeni općih preventivnih mjera u peradarstvu. Treba spriječiti kontakt domaće peradi intenzivnih uzgoja s divljim pticama ili s njihovim izlučevinama. Većina uobičajenih deterdženata inaktivira klamidiju jer sadržava veliku količinu lipida. Uspješno se može dezinficirati kvaternim amonijevim spojevima u omjeru 1:1.000, 70-%tnim izopropilnim alkoholom i klorofenolima. Valja znati da je *C. psittaci* osjetljiva na toplinu, ali otporna na kiseline i lužine (BIĐIN, 2008.).

2.3.8 LIJEČENJE

U slučaju pojave klamidioze veterinar je dužan procijeniti može li se provesti liječenje ptica ili je potrebno neškodljivo uklanjanje. Osobito je važno pravilno liječiti ovu opasnu zoonozu kako bi se uzročnik do kraja uklonio iz zaraženog ptičjeg organizma. Ako se odlučimo za liječenje oboljelih ptica, ono ne zahtijeva samo primjenu dobro odabranih antimikrobnih sredstava i točnu terapijsku dozu lijeka nego i potpurnu terapiju kao što je nadoknada tekućine, grijani okoliš i prehrana obogaćena laktulozom i vitaminima (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Prije provedbe samog liječenja potrebno je pticu zaštititi od stresa (premještanje, hladnoća, loši uvjeti držanja i prehrane) te je redovito promatrati i vagati ako se lijek daje u hrani. Preporučeno je izbjegavati visoku koncentraciju kalcija (sipina kost, mineralni dodaci u obliku kamenja ili drobljenih školjaka) i ostalih kationa u hrani (inhibira resorpciju oralno primijenjenih tetraciklina). Preporučeno je svakodnevno provoditi čišćenje te osigurati čistu vodu i vitaminske pripravke. Za liječenje klinički manifestne klamidioze lijekovi izbora su

tetraciklini i kinoloni. Od tetraciklina najčešće se primjenjuje doksiciklin (bolje se apsorbira i sporije izlučuje iz organizma nego drugi tetraciklini, što omogućuje da se lijek daje u manjim dozama), te klortetraciklin i oksitetraciklin. Lijek se može primjenjivati *per os* (u hrani, u vodi, izravno u kljun) te intramuskularno. Najčešće se daje enrofloksacin koji se pokazao kao lijek izbora u liječenju klamidioze ptica. Preporučuje se prva 3 – 4 dana lijek primijeniti intramuskularno u područje pektoralnih mišića, a nakon toga hranom ili vodom. Liječenje ne smije trajati kraće od 14 dana, a najbolje 21 dan (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

2.3.9 JAVNOZDRAVSTVENI ZNAČAJ

Klamidioza ptica je opasna zoonoza, a nekoliko vrsta bakterija iz roda *Chlamydia* su prenosive sa životinja na čovjeka. Najčešće su to: *C. psittaci*, *C. abortus* i *C. felis*. Zaraza bakterijom *C. psittaci* uslijedi inhalacijom aerosola od izmeta inficiranih ptica. Papige se i dalje smatraju najopasnijim izvorom infekcije, ali zabilježene su i epidemije gdje su za čovjeka izvor bolesti bile nepapagajske vrste ptica, što uključuje i komercijalno uzgajanu perad (LAGAE i sur., 2014.). Vlasnici ptica kućnih ljubimaca posebno su rizična skupina ljudi, zatim veterinarski djelatnici, radnici u peradarskoj proizvodnji, radnici u klaonicama peradi, uzgajivači ptica te djelatnici u trgovinama s pticama (LAGAE i sur., 2014.). Zbog toga se psitakoza u ljudi treba smatrati profesionalnom bolešću. No, izvor opasnosti su i gradski golubovi koji su često u dodiru s ljudima. Međutim, zdravstveni rizik koji oni predstavljaju nije prikladno procijenjen. Općenito su ljudi nedovoljno educirani o riziku zaražavanja klamidiozom, bilo pri čišćenju izlučevina golubova ili u slučajnim kontaktima prilikom hranjenja u javnim parkovima, do dodirivanja pripitomljenih ptica koje se gnijezde na prozorskim daskama. Osobito su rizična skupina imunokompromitirani pacijenti (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Psitakoza u ljudi pojavljuje se sporadično ili epidemijski, a može biti lakšeg do teškog oblika bolesti sa smrtnošću od 0,5 do 1%. Inkubacija je najčešće pet do 14 dana, no moguća je i nešto dulje. Ponekad prolazi inaparentno, ali se pojavljuje i kao sustavna bolest s upalom pluća. Česta je atipična upala pluća s jedva prepoznatljivim znakovima poremećaja rada organa. Klinička slika može varirati od blagih simptoma sličnim gripi, tresavice, povišene temperature, glavobolje, anoreksije, grlobolje pa sve do pojave atipične pneumonije sa suhim kašljem i otežanim ili bolnim disanjem. Od ostalih simptoma

moгу se pojaviti proljev, mučnina, povraćanje, visoka temperatura, glavobolja, mijalgija sa znakovima poremećenog disanja ili bez njih. Vrlo rijetko se pojavljuje teška sustavna bolest koja uključuje endokarditis, miokarditis i bubrežne komplikacije, a opisani su i slučajevi s encefalitisom, meningitisom i mijelitisom. Bolest reagira na liječenje tetraciklinima (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Nakon pandemije psitakoze 1929- - 1930. godine, mnoge su zemlje poduzele kontrolne mjere za sve uvezene papagajske vrste ptica. U Republici Hrvatskoj je od 2001. godine klamidioza uvedena među zarazne i nametničke bolesti životinja koje se sprječavaju, otkrivaju i suzbijaju provođenjem naređenih zakonskih odredbi. U Republici Hrvatskoj utvrđena je prisutnost klamidija u ptica, osobito u golubova, papiga, kanarinaca, nekih divljih ptica, a dokazana je i u domaće peradi i to u purana i u kokoši, te posljedično, na žalost, i u ljudi (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.).

2.3.10 KLAMIDIOZA U DIVLJIH PTICA

Divlje ptice imaju veliku ulogu kao rezervoari klamidioze (LEMUS, 2010.). Kako bi se utvrdila prevalencija *C. psittaci* u divljih ptica, provedeno je istraživanje u Švicarskoj uzimanjem obrisa kloake 527 ptica pjevica, 442 patke, 84 divlja goluba i 38 kormorana. Uzorci su testirani real-time PCR metodom specifičnom za klamidije. Utvrđeno je da je 3,3% divljih golubova pozitivno na klamidije koje su kasnije identificirane kao *C. psittaci*. Od 527 ptica pjevica, samo su dvije bile pozitivne na klamidije. Daljnom dijagnostikom utvrđena je 92%-tna homologija sa *C. suis* kod jedne ptice. Kod pataka je utvrđeno 19 pozitivnih životinja. Utvrđena je 92%-tna homologija sa *C. suis* kod 15 slučajeva, 91%-tna homologija kod 3 slučaja, te 90%-tna homologija kod 1 slučaja. Svi pretraženi kormorani bili su negativni na klamidije. Ovo istraživanje dovodi do zaključka da nema značajnog rizika za prijenos *C. psittaci* sa ptica pjevica i pataka na ljude kao i druge životinje, dok ipak postoji osrednji rizik u urbanim sredinama gdje borave divlji golubovi (ZWEIFEL i sur., 2009.). LEMUS i sur. (2010.) proveli su istraživanje u Španjolskoj na vjetruši (*Falco tinnunculus*) i bjelonoktoj vjetruši (*Falco naumanni*) na tri različite lokacije. Kod životinja sa Los Llanos (LL) utvrđena je prisutnost *C. psittaci*. Na istom području je primijećena pojava klamidija kod ovaca, u prostorijama gdje ovce borave kao i u insekata, što upućuje na križnu infekciju između stoke, insekata i divljih ptica. Primijećen je veći postotak imunoglobulina kod

bjelonokte vjetruše što se pridodaje činjenici da je riječ o pticama koje se hrane insektima, tj. bjeloglavom kornjašu i ravnokrilcima koji prenose *C. psittaci*, kao i tome da se pare u stajama u kojima borave ovce pa su podložnije udisanju uzročnika. Kombinirajući PCR pretragu koja izolira genetski materijal sa determinacijom specifičnih protutijela možemo jasno otkriti jedinke koje su klinički bolesne. Ptice sa LL područja bile su pozitivne na *C. psittaci* serovar A i C, dok su ptice sa Campo Azálvaro (CA) i Los Monegros (LM) područja bile pozitivne na F i G serovarove koji se najčešće javljaju kod grabežljivica. Serovar A se prirodno javlja kod papiga, golubova i vrana, dok se serovar C prirodno javlja kod roda. Grabljivice nisu prirodni domaćini za ijedan od navedenih serovarova. Serovarovi F i G su slabo patogeni i jedino uzrokuju bolest kod imunokompromitiranih životinja. U ovom istraživanju znanstvenici naglašavaju važnost zoonotskog potencijala ovih bakterija u prijenosu sa ptica na ljude (LEMUS i sur., 2010.).

Provedeno istraživanje pojavnosti *C. psittaci* u 540 ljudi u Belgiji uzimanjem obrisaka ždrijela i krvnih uzoraka zajedno sa upitnikom o životnim navikama, pušenju, povijesti bolesti i učestalošću kontakta s raznim pticama dokazalo je da je od 540 ispitanika, njih 47% imalo dnevni kontakt s pticama – najčešće pjevicama i papigama; 10,7% tjedni kontakt – najčešće s golubovima i pjevicama, a 20% sporadičan kontakt – najčešće s papigama i pjevicama, dok 22,2% ispitanika nije bilo u nikakvom kontaktu s pticama. Uzorci su pretraženi koristeći PCR i ELISA metode kao i test mikro-imunofluorescencije. Utvrđeno je 69 obrisaka ždrijela pozitivnih na *C. psittaci* što čini 12,7%. Uspoređujući ove rezultate sa godišnjim izvještajem psitakoze kod ljudi dolazi se do zaključka da je bolest uistinu podcijenjena. Osobe u kontaktu s papigama i golubovima su bile najčešće zaražene, međutim dokazano je da je dnevni kontakt s papigama jednako opasan kao i tjedni kontakt, dok tjedni kontakt s golubovima nije toliko opasan kao dnevni. Ovo nas dovodi do zaključka da su golubovi i papige glavni izvor psitakoze ljudi u usporedbi s drugim životinjama (HARKINEZHAD i sur., 2009.). Prevalenciju različitih vrsta klamidija unutar odabranih vrsta ptica istraživali su KRAWIEC i sur. (2015). Pregledano je 369 slobodnoživućih ptica među kojima je bilo 35 različitih vrsta ptica iz 15 redova. Uzeti su uzorci koji su pretraženi koristeći brzu i osjetljivu real-time PCR metodu. Ukupno je utvrđeno 27 pozitivnih uzoraka (7,3%), od kojih je 81,5% potvrđeno kao *C. psittaci*, 3 su uzorka potvrđeni kao *C. trachomatis*, dok su 2 uzorka klasificirana samo kao rod *Chlamydia*. Provedeno je sekvencioniranje, ali ono nije potvrdilo visok stupanj sličnosti

sa ijednom *Chlamydia* vrstom. Navedeni pozitivni, neklasificirani, uzorci pripadali su golubu grivnjašu (Columbiformes) i običnom škanjcu (Accipitriformes). Svi pozitivni nalazi dobiveni su iz DNK tkiva kao što su pluća, jetra i slezena. Detekcija *C. psittaci* i *C. trachomatis* u slobodnoživućih populacija divljih ptica nameću nam značaj ptica kao rezervoara raznih vrsta klamidija kao i njihovu epidemiološku važnost (KRAWIEC i sur., 2015.).

3 MATERIJALI I METODE

3.1. PRIKUPLJANJE UZORAKA

Za potrebe istraživanja i izrade ovog diplomskog rada korišteno je ukupno 22 obriska konjunktive, ždrijela i kloake različitih vrsta ptica (Tablica 1.). Uzorci su uzeti u Parku prirode Učka tijekom redovitih ljetnih aktivnosti prstenovanja divljih ptica od strane udruge Biom. Životinje su lovili stručnjaci iz udruge koji su licencirali prstenovači od strane Ornitološkog zavoda. Svi prikupljeni uzorci su dostavljeni na Zavod za bolesti peradi s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu gdje su pretraživani u ovlaštenom laboratoriju za klamidije koristeći metodu real-time PCR.

Od ukupnog broja uzorka, njih 16 potjecalo je od crvendaća (*Erithacus rubecula*), 2 su uzorka bila od crnokape grmuše (*Sylvia atricapilla*), te po jedne plavetne sjenice (*Cyanistes caeruleus*), dugorepe sjenice (*Aegithalos caudatus*), zebe (*Fringilla coelebs*) i krstokljuna (*Loxia curvirostra*).

Do provođenja metode za izdvajanje DNK uzorci su čuvani u hladnjaku na temperaturi od 4°C.

Tablica 1. Ptice od kojih su uzeti uzorci za istraživanje.

BROJ UZORKA	VRSTA PTICE	BROJ PRSTENA
1.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ56295
2.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89553
3.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89550
4.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89544
5.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89551
6.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89472
7.	Krstokljun (<i>Loxia curvirostra</i>)	BJ19592
8.	Plavetna sjenica (<i>Cyanistes caeruleus</i>)	BJ55426
9.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89548
10.	Crnokapa grmuša (<i>Sylvia atricapilla</i>)	BA434258
11.	Dugorepa sjenica (<i>Aegithalos caudatus</i>)	AA51711
12.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89555
13.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89542
14.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89546
15.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ434247
16.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89545
17.	Crnokapa grmuša (<i>Sylvia atricapilla</i>)	BA434256
18.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89516
19.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89549
20.	Zeba (<i>Fringilla coelebs</i>)	BA434257
21.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89548
22.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89552

3.2. PRIPREMA UZORAKA I IZDVAJANJE DNK

Uzorci su pripremljeni u mikrobiološkom zaštitnom kabinetu KTB – NS – 1 (Klimaoprema, Hrvatska), koji štiti operatera od mogućeg zaražavanja udisanjem čestica prašine i/ili izmeta nastalih prilikom pripreme uzoraka. Pri pripremi obriska prvo je škarama potrebno odrezati sterilni jednokratni nastavak za pipete zapremnine 1 ml tako da pristaje u mikroepruvetu zapremnine 2 ml. Vatirani dio obriska odrezan je škarama na cca. 1 cm duljine, pri čemu se ne smije dirati dio s vatom kako bi se spriječila kontaminacija, i ubačen u sterilni odrezani nastavak, te je dodano 0,5 ml sterilne destilirane vode i centrifugirano na 8000 rpm 5 minuta.

Ukupna genomska DNK/RNK izdvojena je pomoću komercijalnog kita *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (Roche, SAD), prema uputama proizvođača.

3.3. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM U STVARNOM VREMENU (real - time PCR)

Identifikacija klamidija obavljena je pomoću lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (real – time PCR) specifičnog za *Chlamydiaceae*, a zatim za svaku pojedinu vrstu klamidija (Tablica 2.). Svaki uzorak mora se raditi u duplikatu, uz pozitivnu i negativnu kontrolu koji su također u duplikatu. Pozitivnu kontrolu čini, ovisno o tome koju vrstu pretražujemo, vrsta *C. psittaci*, *C. gallinacea* ili *C. avium*. Negativnu kontrolu uvijek čini ultračista voda.

Plastične mikroepruvetice za izvođenje reakcije zapremnine 0,2 ml (stripovi od 8 mikroepruvetica) rasporede se na stalku, tako da njihov broj odgovara broju uzoraka i kontrola u duplikatu. Mikroepruvetice se moraju začepiti prikladnim čepovima sa ravnim poklopcem. Položaj uzoraka istovjetan je onom upisanom u pripadajući obrazac.

Uzorci su analizirani uređajem Mx3005P (Stratagene, SAD) pomoću TaqMan sustava identifikacije umnoženih odsječaka, pri slijedećim uvjetima: 2 minute na 50°C, zatim 95°C

tijekom 10 minuta, umnažanje tijekom 50 ciklusa s denaturacijom pri 95°C tijekom 15 sekundi, sparivanje početnica pri 60 °C tijekom 60 sekundi kada se očitava fluorescencija. Krivulja taljenja očitana je u slijedećem segmentu, nakon umnažanja, kontinuiranim očitavanjem fluorescencije u rasponu od 60°C do 95°C. U svaki ciklus obavezno treba uključiti pozitivnu kontrolu, kao i negativnu.

Prema dobivenim podacima određuju se pozitivni, odnosno negativni uzorci na prisutnost *Chlamydiaceae*. Kao pozitivan na bakterije porodice *Chlamydiaceae* ili svaku specifičnu vrstu opisujemo onaj uzorak koji je u oba ponavljanja (duplikatu) imao Ct vrijednost (točka umnažanja prema graničnoj vrijednosti) ispod 42. Ako je Ct vrijednost između 42,00 i 44,90 uzorak je sumnjivo pozitivan i pretraga se mora ponoviti. Ako negativna kontrola i u samo jednom ponavljanju ima Ct vrijednost ispod 40,00 mora se ponoviti pretraga svih uzoraka u toj seriji.

Tablica 2. Prikaz početnica za izvođenje real-time PCR reakcije.

Vrsta klamidija	Gen	Početnice	Proba
<i>Chlamydiaceae</i>	23S	CTGAAACCAGTAGCTTATAAGCGGT ACCTCGCCGTTTAACTTAACTCC	FAM-CTCATCATGCAAAAGGCACGCCG- TAMRA
<i>C. psittaci</i>	incA	GCCATCATGCTTGTTTCGTTT CGGCGTGCCACTTGAGA	FAM- TCATTGTCATTATGGTGATTGAGGA- TAMRA
<i>C. gallinacea</i>	enoA	CAATGGCCTACAATTCCAAGAGT CATGCGTACAGCTTCCGTAAAC	FAM-ATTCGCCCTACGGGAGCCCTT-TAMRA

4 REZULTATI

Tijekom pretraživanja ukupno 22 uzorka obriska konjunktive, ždrijela i kloake ptica različitih vrsta na bakteriju *C. psittaci* i *C. gallinacea* dobiveni su rezultati prikazani u Tablici 3. Od ukupnog broja pretraženih obrisaka, njih 13 bilo je pozitivno na prisutnost bakterija porodice *Chlamydiaceae*, a 9 je bilo negativno. Od 13 pozitivnih, svi uzorci bili su negativni na prisutnost vrsta *C. psittaci* i *C. gallinacea*. Gledano po vrstama, devet pozitivnih bile su ptice vrste crvendać, a zatim dvije crnokape grmuše i jedan krstokljun (Tablica 4.).

Tablica 3. Rezultati Real-Time PCR pretrage za dokaz bakterija porodice *Chlamydiaceae*.

BROJ UZORKA	VRSTA PTICE	BROJ PRSTENA	REZULTAT REAL-TIME PCR (ct)		NALAZ
1.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ56295	41,96	40,22	Pozitivno
2.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89553	39,46	40,19	Pozitivno
3.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89550	-	-	Negativno
4.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89544	38,05	36,89	Pozitivno
5.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89551	39,12	40,18	Pozitivno
6.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89472	-	-	Negativno
7.	Krstokljun (<i>Loxia curvirostra</i>)	BJ19592	37,21	37,77	Pozitivno
8.	Plavetna sjenica (<i>Cyanistes caeruleus</i>)	BJ55426	-	-	Negativno
9.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89548	-	-	Negativno
10.	Crnokapa grmuša (<i>Sylvia atricapilla</i>)	BA434258	38,30	40,00	Pozitivno
11.	Dugorepa sjenica (<i>Aegithalos caudatus</i>)	AA51711	39,67	34,98	Pozitivno
12.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89555	41,00	40,94	Pozitivno
13.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89542	-	-	Negativno
14.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89546	-	-	Negativno
15.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ434247	38,40	39,41	Pozitivno
16.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89545	39,63	38,80	Pozitivno
17.	Crnokapa grmuša (<i>Sylvia atricapilla</i>)	BA434256	35,74	36,12	Pozitivno
18.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89516	-	-	Negativno
19.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89549	-	-	Negativno
20.	Zeba (<i>Fringilla coelebs</i>)	BA434257	-	-	Negativno
21.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89548	39,05	38,66	Pozitivno
22.	Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	BJ89552	39,39	38,25	Pozitivno

Tablica 4. Rezultati Real-Time PCR pretrage prema vrstama ptica.

Vrsta ptice	Broj pozitivnih/broj pretraženih	Postotak
Crvendać (<i>Erithacus rubecula</i>)	9 / 16	56,25%
Crnokapa grmuša (<i>Sylvia atricapilla</i>)	2 / 2	100%
Krstokljun (<i>Loxia curvirostra</i>)	1 / 1	100%
Dugorepa sjenica (<i>Aegithalos caudatus</i>)	1 / 1	100%
Plavetna sjenica (<i>Cyanistes caeruleus</i>)	0 / 1	-
Zeba (<i>Fringilla coelebs</i>)	0 / 1	-

5 RASPRAVA

Baterije porodice *Chlamydiaceae*, unutarstanični patogeni različitih vrsta životinja i ljudi, mogu uzrokovati sustavnu, kontagioznu bolest s različitim kliničkim znakovima. Zna se da različite vrste ptica mogu prenijeti bakteriju *C. psittaci* na čovjeka, no poznato je da ptice mogu biti nosioci i nekih drugih klamidija (*C. abortus*, *C. pecorum* ili novih, tek nedavno opisanih vrsta *C. avium* i *C. gallinacea*).

U ptica reda Psittaciformes klamidija je prisutna u oko 1% populacije koja živi u divljini, pa se smatra endemičnom vrstom. Dugo se vjerovalo da je bolest učestala samo u papiga, no 1940. godine opisana je i u golubova, a 1950-ih godina počela se pridavati važnost i inficiranim patkama i puranima koji su bili izvor infekcije za čovjeka (PRUKNER-RADOVČIĆ, 2010.). Istraživanja vezana za pojavnost klamidija u divljih i slobodnoživućih ptica uglavnom su pokazala da nema značajnog rizika za prijenos *C. psittaci* sa ptica pjevica i pataka na ljude kao i druge životinje, dok ipak postoji osrednji rizik u urbanim sredinama gdje borave divlji golubovi (ZWEIFEL i sur., 2009.). S druge strane, dokazan je prijenos patogenih serovarova *C. psittaci* između stoke, insekata i divljih ptica grabljivica u Španjolskoj čime se naglašava važnost zoonotskog potencijala ovih bakterija u prijenosu sa ptica na ljude (LEMUS i sur., 2009.)

U Republici Hrvatskoj godišnjom Naredbom o mjerama zaštite životinja od zaraznih i nametničkih bolesti i njihovom financiranju koju propisuje Ministarstvo poljoprivrede, određeno je obavezno slanje uzoraka od ptica u uzgoju, onih koje odlaze na natjecanja ili su namijenjene prodaji, u ovlaštenu laboratorij za klamidije. Time je omogućeno otkrivanje i onih ptica koje nemaju kliničke znakove bolesti, a izlučuju uzročnika u okoliš i tako predstavljaju potencijalni izvor zaraze. U navedenoj Naredbi nigdje nisu spomenute druge vrste ptica, te nije potrebno slanje njihovih uzoraka da bi se provjerila prisutnost bakterija porodice *Chlamydiaceae*.

Iz spomenutog razloga, a i zbog ranije poznatih nalaza ovih bakterija u slobodnoživućih vrsta ptica, ovim istraživanjem obuhvaćeno je ukupno 22 uzoraka porijeklom od 6 vrsta ptica iz porodice vrapčarki. Svi ovi uzorci uzeti su prilikom redovitog procesa prstenovanja, a potjecali su od ptica koje nisu pokazivale znakove bolesti.

U ovom istraživanju za dokaz klamidija porodice *Chlamydiaceae* i specifičnih vrsta korišten je real-time PCR, vrlo osjetljiva, brza i pouzdana metoda koja se rutinski koristi u akreditiranom Laboratoriju za klamidije Zavoda za bolesti peradi s klinikom. Korištenjem specifičnih početnica koje umnažaju odsječak DNK 23S rRNA i *enoA* gena, uz posebnu probu obilježenu pomoću TaqMan boje, određuju se pozitivni ili negativni uzorci prema dobivenim Ct vrijednostima (Ct vrijednost = točka umnažanja prema graničnoj vrijednosti). Kao pozitivan opisujemo onaj uzorak koji je u oba ponavljanja (u duplikatu) ima Ct vrijednost ispod 42.

Od sveukupno 22 pretražena obriska kloake njih 13 bilo je pozitivno na prisutnost bakterija porodice *Chlamydiaceae*, a 9 je bilo negativno. Gledano po vrstama, devet pozitivnih bile su ptice vrste crvendać, a zatim dvije crnokape grmuše i jedan krstoljun. Od 13 pozitivnih, svi uzorci bili su negativni na prisutnost vrsta *C. psittaci* i *C. gallinacea*, čime ove pozitivne uzorke možemo opisati kao neklasificirane. Takav nalaz podudara se sa istraživanjem koje su proveli su KRAWIEC i sur. (2015). U njihovom istraživanju pretraženo je 369 uzoraka koji su potjecali od slobodnoživućih ptica, te su našli 7,3% pozitivnih, od kojih je 81,5% identificirano kao *C. psittaci*, a 7,4% su klasificirana samo kao rod *Chlamydia*, za koje i nakon sekvencioniranja nisu potvrdili sličnost sa nekom poznatom vrstom klamidija.

Značajno je i naglasiti da su svi uzorci porijeklom od krstokljuna, crnokape grmuše i dugorepe sjenice bili pozitivni, no radi se svega o jednom ili dva uzorka porijeklom od iste vrste ptica. S druge strane ukupno 56,25% uzoraka porijeklom od crvendaća bilo je pozitivno.

Dokaz bakterija porodice *Chlamydiaceae* u slobodnoživućih ptica svakako bi bilo potrebno provesti na većem broju uzoraka, posebno u onih koje možda pokazuju neke od kliničkih znakova klamidioze. Takvim istraživanjem možda bi bilo moguće i dokazati koje se sve vrste neklasificiranih klamidija mogu identificirati, te da li se one genotipski razlikuju od klamidija nađenih u drugih vrsta ptica.

6. ZAKLJUČCI

1. Klamidioza je učestala bolest različitih vrsta ptica kućnih ljubimaca, peradi i slobodnoživućih ptica.
2. Od sveukupno 22 pretražena obriska kloake njih 13 bilo je pozitivno na prisutnost bakterija porodice *Chlamydiaceae*, a 9 je bilo negativno.
3. Gledano po vrstama ptica, pozitivni su bili crvendaći (56,25% uzoraka), crnokape grmuše (100%) i krstoljun (100%).
4. Od pozitivnih, svi uzorci bili su negativni na prisutnost vrsta *C. psittaci* i *C. gallinacea*.
5. Istraživanje je potrebno provesti na većem broju uzoraka, te dokazati i moguću prisutnost vrste *C. avium*, ili pristupiti sekvencioniranju pozitivnih uzoraka kako bi se dokazala moguća sličnost sa nekim drugim vrstama klamidija.

7. LITERATURA

1. BIDIN, Z. (2008): Bolesti peradi. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb
2. HARKINEZHAD, T., K. VERMINNEN, M. DE BUYZERE, E. RIETZSCHEL, S. BEKAERT, D. VANROMPAY (2009): Prevalence of *Chlamydophila psittaci* infections in a human population in contact with domestic and companion birds. J Med Microbiol. Doi: 10.1099/jmm.0.0113790-0.
3. KRAWIEC, M., T. PIASECKI, A. WIELICZKO (2015): Prevalence of *Chlamydia psittaci* and other *Chlamydia* species in wild birds in Poland. Vector-borne and zoonotic diseases. 11, DOI: 10.1089/vbz.2015.1814.
4. LAGAE S., I. KALMAR, K. LAROUCAU, F. VORIMORE, D. VANROMPAY (2014): Emerging *Chlamydia psittaci* infections in chickens and examination of transmission to humans. J Med Microbiol. 63, 399-407.
5. LEMUS, J.A., J.A. FARGALLO, P. VERGARA, D. PAREJO, E. BANDA (2010): Natural cross chlamydial infection between livestock and free-living bird species. PloS ONE 5 (10), e13512. doi:10.1371/journal.pone.0013512
6. PRUKNER-RADOVČIĆ, E. (2010): Bolesti ptica kućnih ljubimaca. Medicinska naklada. Zagreb. Hrvatska.
7. TUTIŠ, V., J. KRALJ, D. RADOVIĆ, D. ĆIKOVIĆ, S. BARIŠIĆ (2013): Crvena knjiga ptica Hrvatske. Ministarstvo zaštite okoliša i prirode. Državni zavod za zaštitu prirode. Hrvatska
8. SACHSE, K., E. VRETOU, M. LIVINGSTONE, N. BOREL, A. POSPISCHIL, D. LONGBOTTOM (2009): Recent developments in the laboratory diagnosis of chlamydial infections. Vet Microbiol. 135, 2-21.
9. SACHSE, K., P.M. BAVOIL, B. KALTENBOECK, R.S. STEPHENS, C.-C. KUO, R. RODELLO-MORA, M. HORN (2015): Emendation of the family *Chlamydiaceae*: proposal of a single genus *Chlamydia* to include all currently recognized species. Systematic and Applied Microbiology. Doi: 10.1016/j.syapm.2014.12.
10. SVENSSON, L., K. MULLARNEY, D. ZETTERSTRÖM (2014): Collins bird guide. Harper Collins Publishers Ltd. London, UK.

11. ZWEIFELD, D., R. HOOP, K. SACHSE, A. POSPISCHILL, N. BOREL (2009): Prevalence of *Chlamydophila psittaci* in wild birds – potential risk for domestic poultry, pet birds, and public health. Eur J Wildl Res 55, 575–581.
12. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Ptice> (pristupljeno 08.05.2017)
13. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Perad> (pristupljeno 08.05.2017)
14. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Neognathae> (pristupljeno 08.05.2017)
15. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Ptice#Anatomija> (pristupljeno 09.05.2017)
16. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Vrap%C4%8Darke> (pristupljeno 09.05.2017)
17. <http://www.zivotinjsko-carstvo.com/ptice/kucica%20za%20ptice%20crvendace.php> (pristupljeno 10.05.2017)
18. <http://www.plantea.com.hr/crnokapa-grmusa/> (pristupljeno 10.05.2015)
19. <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=34212> (pristupljeno 10.05.2017)

8. SAŽETAK

Baterije porodice *Chlamydiaceae*, unutarstanični patogeni različitih vrsta životinja i ljudi, mogu uzrokovati sustavnu, kontagioznu zarazu s različitim kliničkim znakovima. Slobodnoživeće ptice, posebno one iz najbrojnije porodice gnjezdarica u Hrvatskoj – vrapčarki, mogu prenositi brojne patogene mikroorganizme u okolišu, te shodno tome predstavljaju moguću prijetnju za zdravlje ljudi, posebno onih koji su u bliskom kontaktu sa zaraženom pticom.

Radi navedenog, u ovom istraživanju cilj je bio dokazati baterije iz porodice *Chlamydiaceae* u pretraživanim obriscima konjunktiva, ždrijela i kloake, porijeklom od različitih vrsta slobodnoživećih vrapčarki, ulovljenih prilikom prstenovanja u Parku prirode Učka. Ovim istraživanjem obuhvaćena su ukupno 22 obriska konjunktiva, ždrijela i kloake porijeklom od šest vrsta ptica iz porodice vrapčarki (16 uzoraka potjecalo je od crvendaća, dva od crnokape grmuše, a po jedan uzorak uzet je od krstokljuna, plavetne sjenice, zebe i dugorepe sjenice). Uzorci su potjecali od ptica koje nisu pokazivale kliničke znakove klamidioze. Dokaz bakterija porodice *Chlamydiaceae*, te vrsta *C. psittaci* i *C. gallinacea* obavljen je pomoću realtime PCR, uz dokaz 23S rRNA, *incA* i *enoA* gena.

Od ukupnog broja pretraženih obrisaka, njih 13 bilo je pozitivno na pristupnost bakterija porodice *Chlamydiaceae*, a 9 je bilo negativno. Od 13 pozitivnih, svi uzorci bili su negativni na prisutnost vrsta *C. psittaci* i *C. gallinacea*. Gledano po vrstama, devet pozitivnih bile su ptice vrste crvendać, a zatim dvije crnokape grmuše i jedan krstokljun.

Dokaz bakterija porodice *Chlamydiaceae* u slobodnoživećih ptica svakako bi bilo potrebno provesti na većem broju uzoraka, posebno u onih koje možda pokazuju neke od kliničkih znakova klamidioze. Takvim istraživanjem možda bi bilo moguće i dokazati koje se sve vrste neklasificiranih klamidija mogu identificirati, te da li se one genotipski razlikuju od klamidija nađenih u drugih vrsta ptica.

9. SUMMARY

Presence of *Chlamydiaceae* in different species of free living bird

Bacteria of the family *Chlamydiaceae* are important intracellular pathogens of different animals' species and humans. They can cause systemic, contagious infection with various clinical signs. Free living birds, especially those that belong to the largest group of birds in Croatia – Passeriformes, can transmit numerous pathogenic microorganisms in the environment and pose a possible threat to people's health, especially those in close contact with the infected bird.

The aim of this study was to detect *Chlamydiaceae* in conjunctival, pharyngeal and cloacal swabs, originating from various types of passerines, caught in the Učka Nature Park. This survey included a total of 22 samples, originating from six bird species of Passeriformes (16 samples came from *Erithacus rubecula*, two from *Sylvia atricapilla*, and one sample was taken from *Loxia curvirostra*, *Cyanistes caeruleus*, *Aegithalos caudatus* and *Fringilla coelebs*. Samples were taken from birds that did not show clinical signs of chlamydiosis. Bacteria of the family of *Chlamydiaceae*, and of *C. psittaci* and *C. gallinacea* species were detected by realtime PCR.

Of the total number of examined samples, 13 were positive for the bacteria of the *Chlamydiaceae* family, and 9 were negative. Of the 13 positive, all samples were negative for the presence of *C. psittaci* and *C. gallinacea*. Seen by bird species, nine positive birds were *Erithacus rubecula*, and then two *Sylvia atricapilla* and one *Loxia curvirostra*. Detection of the *Chlamydiaceae* in passerine birds would certainly need to be carried out on a larger number of samples, especially those that may show some of the clinical signs of chlamydiosis. By such research, it might be possible to prove which types of unclassified chlamydia can be identified and whether those genotypes differ from chlamydia found in other species of birds.

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 18. prosinca 1991. godine u Splitu gdje sam pohađala osnovnu školu. Drugu (jezičnu) gimnaziju u Splitu sam upisala 2006. godine. Maturirala sam 2010. godine kada sam upisala prvu godinu Veterinarskog fakulteta.